

**UNTERSUCHUNGEN VON PHYCOERYTHRIN
UND PHYCOCYANIN AUS PSEUDANABAENA
W 1173 IM VERGLEICH MIT ANDEREN
CYANOBAKTERIEN (BLAUALGEN)**

Rudolf Wagenmann

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0017

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

UNTERSUCHUNGEN VON PHYCOERYTHRIN UND PHYCOCYANIN
AUS PSEUDANABAENA W 1173 IM VERGLEICH MIT
ANDEREN CYANOBAKTERIEN (BLAUALGEN)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt
von
Rudolf Wagenmann
aus
Mannheim

1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. H. Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1977

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rüdiger für das Interesse und die zahlreichen Anregungen, die er meiner Arbeit jederzeit zuteil werden ließ.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Prof. Dr. F. Schötz und Frau H. Bathelt.

Frau I. Blos danke ich für die technische Mithilfe bei der elektrophoretischen Isolierung von Phycoerythrin.

Der Phagentest wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Rembold vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes während dieser Zeit.

Für die stete Unterstützung während des Phagentestes bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Eder und Frau H. Baumann.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Vorkommen, Bedeutung und Lokalisierung der Bili- proteide	1
1.2. Chemische Natur	2
1.3. Bisherige Ergebnisse und Untersuchungsmethoden an C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin	3
1.4. Immunologie	5
1.5. Chromatische Adaptation	6
1.6. Problemstellung	7
2. Vergleichende Untersuchungen von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien, unter Berücksichtigung der Biliproteide einer selbstisolier- ten Species	8
2.1. Isolierung einer C-Phycoerythrin synthetisieren- den Alge	8
2.1.1. Systematik der Blaualgen	8
2.1.2. Mikroskopische Bestimmung der isolierten Algenspecies	9
2.1.3. Vergleich von Pseudanabaena Stamm W 1173 mit Pseudanabaena catenata	10
2.2. Anzucht und Aufschluß verschiedener Algen	11
2.2.1. Wahl einer geeigneten Zellaufschlußmethode	13
2.2.2. Herstellung der Rohextrakte	16
2.3. Physikalisch-chemische Untersuchungen an C-Phyco- erythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyano- bakterien	16
2.3.1. Elektrophoretische Untersuchung verschie- dener Blaualgenrohextrakte	16
2.3.2. Isoelektrische Fokussierung von C-Phyco- erythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyanobakterien	24
2.3.3. Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phy- cocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien	30

2.3.4. Molekulargewichtsbestimmung von Pseudanabaena W 1173 C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus dem Rohextrakt	32
2.3.5. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien	32
2.3.6. Untersuchung der Chromophoranzahl der Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-untereinheiten	40
2.3.7. Untersuchung von gelelektrophoretisch erhaltenen Phycocyanin-Eluaten	43
2.3.8. Molekulargewichtsbestimmungen der Phycocyanineluate vor und nach Inkubation mit 8 M Harnstoff und β -Mercaptoäthanol	46
3. Proteolyse	49
4. Untersuchung eines besonderen Phycoerythrins aus Phormidium autumnale (C5)	54
5. Immunologischer Vergleich von Phycoerythrin aus verschiedenen Cyanobakterien mit Hilfe des Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-Antiserums	60
5.1. Herstellung von Antikörpern gegen C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173	61
5.2. Doppeldiffusion nach Ouchterlony	62
5.3. Phagentest	64
5.3.1. Prinzip des Phagentestes und Anwendungsmöglichkeiten	64
5.3.2. Herstellung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates	66
5.3.3. Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum	67

5.3.4. Hemmung der Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T ₄ -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum mit freiem Phycoerythrin	69
5.3.5. Hemmung der Inaktivierung eines partiell trypsinabgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins	73
5.5. Quantitative Präzipitationsreaktion heterologer Phycoerythrine mit Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum	78
5.6. Gesamtbetrachtung der immunologischen Ergebnisse	80
6. Untersuchung des Adaptationsverhaltens verschiedener Cynaobakterien	83
7. Elektronenmikroskopie	94
8. Zusammenfassung der Ergebnisse	101
9. Experimenteller Teil	104
9.1. Isolierung einer C-Phycoerythrin synthetisierenden Alge (Pseudanabaena W 1173)	104
9.2. Aufzucht und Aufschluß verschiedener Blaualgenstämmen	105
9.2.1. Herkunft der verwendeten Blaualgen	105
9.2.2. Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	106
9.3. Sterilisationsverfahren	110
9.4. Überimpfmethoden	110
9.5. Algenaufzucht	111
9.5.1. Stammkulturen	111
9.5.2. Kolbenkulturen	111
9.5.3. Flaschenkulturen	112
9.5.4. Tonnenkulturen	114
9.6. Erntebedingungen	114
9.7. Ausbeuten	114

	Seite
9.8. Aufschluß der Algenzellen	115
9.9. Herstellung der Rohextrakte	115
10. Tris-Glycin-Elektrophorese	115
11. Isoelektrische Fokussierung	117
12. Präparative Gelelektrophorese zur Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien	118
13. Molekulargewichtsbestimmung von Pseudanabaena W 1173 C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus dem Rohextrakt	119
14. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cya- nobakterien mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese	120
15. Gelelektrophoretische Isolierung der Pseudanabaena W 1173 Untereinheiten	122
15.1. Proteinbestimmung der gelelektrophoretisch isolierten Pseudanabaena W 1173 Untereinheiten	123
15.2. Densitometrie der aufgetrennten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten, vor und nach Anfärben mit Coomassie-Blau	123
16. Molekulargewichtsbestimmung der Phycocyanineluate vor und nach Inkubation mit 8 M Harnstoff und β -Mer- captoäthanol	124
17. Bedingungen für die spektralen Veränderungen des C5-Phycoerythrins aus Phormidium autumnale	124
17.1. Säulenchromatographische Isolierung des Phyco- erythrins aus Phormidium autumnale (C5)	125
18. Immunisierung der Kaninchen	125
19. Durchführung der Doppeldiffusion nach Ouchterlony	126
19.1. Herstellung der Agaroseplatten	126
19.2. Geldiffusion	127
20. Verwendeter Bakteriophagenstamm	127
20.1. Herstellung des Pseudanabaena Phycoerythrin- Bakteriophagen T_4 -Konjugates	127

	Seite
20.2. Grobe Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates mit Antiphycoerythrinantiserum	129
20.3. Grobe Hemmung der Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum mit freiem Protein	131
20.4. Bedingungen für den Trypsin-Teilabbau des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins	131
20.5. Quantitative Präzipitationsreaktion	134
Literaturverzeichnis	135

Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiaminoessigsäure, Na_4 - und Na_2 -Salz
M_B	Elektrophoretische Mobilität bezogen auf Bromphenolblau
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
PE I	natives Phycoerythrin
PE II	proteolytisch degradiertes Phycoerythrin
pfu	plaques forming units (auszählbare Lysehöfe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Vorkommen, Bedeutung und Lokalisierung der Biliproteide

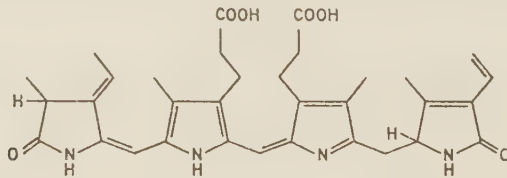
Unter dem Begriff Biliproteide (97) versteht man Farbstoffe, die in Blaualgen (Cyanobakterien), Rotalgen (Rhodophyta) und Cryptomonaden vorkommen. Im einzelnen handelt es sich hierbei um Phycoerythrin (rot), Phycocyanin (blau) und Allophycocyanin (blau). Je nach Herkunft und spektralen Eigenschaften unterscheidet man zwischen R-, B-, C-Phycoerythrin und R-, C-Phycocyanin. Allophycocyanin kommt einheitlich sowohl bei Cyanobakterien als auch bei Rotalgen in geringen Mengen vor. Phycocyanin und Allophycocyanin findet man in allen Blaualgen, Phycoerythrin dagegen ist ein zusätzliches Pigment, das bei den Cyanobakterien weniger häufig vorkommt.

Mit Hilfe dieser Pigmente werden die Algen befähigt, neben den von Chlorophyll a absorbierten, zusätzliche Wellenlängen des sichtbaren Lichtes auszunutzen, was eine Optimierung der Photosynthese zur Folge hat. Da Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin die Lichtenergie direkt oder indirekt auf das Chlorophyll a des Photosynthesesystems II übertragen, nennt man sie akzessorische Pigmente (3,32). Diese photosynthetisch aktiven Pigmente liegen in der Zelle polyaggregiert als "Phycobilisomen" auf der Außenseite der Thylakoidmembran.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Phycobilisomen bei Cyanobakterien (120) basieren auf einem Vergleich mit Rotalgenphycobilisomen, wo sie zum erstenmal gefunden wurden (44,47,118). So fand man für die vorherrschend in Rotalgen vorkommenden B-Phycoerythrin- und R-Phycoerythrinaggregationen (76) kugelförmige bzw. stangenförmige Phycobilisomenstrukturen. C-Phycocyaninphycobilisomen haben eine scheibenförmige Struktur (53), wohingegen C-Phycoerythrin (45) keine eindeutige Form zu bilden scheint. Die Biliproteine der Cryptomonaden kommen nicht in Form von Phycobilisomen vor, sondern sind diffus innerhalb der Thylakoide verteilt (46).

1.2. Chemische Natur

Alle diese Pigmente sind Chromoproteide, wobei der farbgebende Chromophor kovalent an den hochmolekularen Proteinanteil gebunden ist. Die von LEMBERG (74,75) vorgeschlagene Bezeichnung Phycobiline wurde von O'HEOCHA (95) durch Biliproteine ersetzt. Dieser Terminus beinhaltet die Beschreibung - Gallenfarbstoff-proteinkomplex -, der nicht nur in Algen vorkommt. Die Vermutung von MOLISCH (87,88), daß diese Pigmente Eiweißnatur besitzen, wurde durch gründliche Untersuchungen von KYLIN (71) und LEMBERG bestätigt. Durch alkalische Hydrolyse gelang es LEMBERG von einem Rotalgenphycocerythrin eine chromophore Gruppe abzuspalten, die eine gallenfarbstoffähnliche Struktur hatte. Kernresonanz und massenspektroskopische Untersuchungen der durch Säure oder heißem Methanol abgespaltenen Chromophore ergaben die in Abbildung 1 und 2 dargestellten Strukturen (92,22). Der Chromophor von Phycocyanin wurde Phycocyanobilin, der von Phycocerythrin Phycocerythrobilin bezeichnet. Da bei der Abspaltung der chromophoren Gruppe unter milden Bedingungen bereits spektrale und damit auch strukturelle Veränderungen auftreten, schlugen RÜDIGER et al. (108) für die so erhaltenen Pigmente die Namen Phycobiliverdin bzw. Phycobiliviolin vor.



1.3. Bisherige Ergebnisse und Untersuchungsmethoden an C-Phycocyanin und C-Phycocerythrin

Die klassische Methode zur Abtrennung der Biliproteide aus wäßrigen Extrakten besteht im Aussalzen der Proteine mit verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen, wobei das Phycocerythrin schon bei 30 % (g/v) Sättigung ausfällt, wohingegen für Phycocyanin und Allophycocyanin höhere Konzentrationen notwendig sind. Das am häufigsten untersuchte Biliprotein ist das C-Phycocyanin. SVEDBERG und KATSURAI (111) fanden für das C-Phycocyanin aus Aphanizomenon flos-aquae ein Molekulargewicht nahe beim isoelektrischen Punkt (pH 4,7) von 208 000. Gleichzeitig zeigten sie, daß dieses Molekül je nach pH-Wert Aggregate erkennen ließ, wobei die kleinste Einheit um 34 000 lag. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der Sedimentationsgleichgewichts- und Sedimentationsgeschwindigkeitsmethode erhalten. ERIKSSON-QUENSEL (36) fand, daß diese von SVEDBERG und KATSURAI erhaltenen Werte zu niedrig lagen, da ihre Sedimentationskonstanten Dichte und Viskosität des Lösungsmittels nicht berücksichtigten. Sie ermittelte ein Molekulargewicht von 270 000 - 290 000, was von O'hEOCHA bestätigt wurde.

HATTORI und FUJITA (60) fanden für das C-Phycocyanin aus Tolythrix tenuis ein Molekulargewicht von 138 000, jedoch bei einem pH-Wert von 7,2. Nach O'hEOCHA (97) verdoppelt sich dieser Wert bei der Bestimmung am isoelektrischen Punkt auf 276 000. Diese Bestimmungen wurden ebenfalls mit Hilfe der Sedimentationsgeschwindigkeitsmethode erhalten. Nur wurde hier zum erstenmal neben der Ammoniumsulfatfällung die säulenchromatographische Trennung auf Tricalciumphosphatgel zur Vorreinigung des Phycocyanins angewendet. BERNIS et al. (8) ermittelten für das C-Phycocyanin aus Plectonema calothricoides eine ähnlich hohe Sedimentationskonstante wie HATTORI und FUJITA (60). Hier jedoch waren bereits bei pH 4,7 kleinere Komponenten mit niedrigeren Sedimentationskonstanten zu finden. Zahlreiche Untersuchungen von BERNIS et al. (9), KAO et al. (64) beschäftigten sich mit der Molekulargewichtsbestimmung des monomeren Phycocyanins. Nach An-

wendung verschiedener Methoden, wie Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung, Disk-Elektrophorese und Immundiffusionsexperimente, postulierten sie ein Molekulargewicht von 30 000. Ähnliche Ergebnisse erhielten NEUFELD und RIGGS (90) anhand der Gelfiltration und Sedimentationsanalyse. Aufgrund von Aminosäureanalysen geben COPE et al. (23) ein Molekulargewicht von 21 000 - 25 000 an.

C-Phycoerythrin

Weit weniger Untersuchungen wurden mit C-Phycoerythrin aus Cyanobakterien angestellt. Auch hier beruhen die ersten Untersuchungen auf Sedimentationsmessungen von HATTORI und FUJITA (60). So fanden sie für das C-Phycoerythrin aus Tolypothrix tenuis im pH-Bereich von 5,7 - 7,2 ein Molekulargewicht von 226 000. Im pH-Bereich von 8,3 begann das Molekül zu disaggregieren. BENNETT und BOGORAD (5) ermittelten für das größte Aggregat des C-Phycoerythrins aus Fremyella diplosiphon mit Hilfe einer geeichten Sephadex G 200 Säule ein Molekulargewicht von $191\,500 \pm 15\,000$.

Untereinheiten

Für alle bisher untersuchten C-Phycocyanine, C-Phycoerythrine und Allophycocyanine konnte inzwischen nachgewiesen werden, daß sie aus Untereinheiten bestehen, die sich im Molekulargewicht der Ketten meist unterscheiden. Diese Ergebnisse wurden sowohl gelelektrophoretisch als auch durch Gelfiltration in Gegenwart von Detergentien, wie Natriumdodecylsulfat, Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff erhalten. Weiterhin unterscheiden sich die Isolierungsmethoden und die pH-Werte der Aufnahmebuffer, die mit Ammoniumsulfat oder durch Ultrafiltration angereicherten Biliproteide. BENNETT und BOGORAD (5) fanden für die C-Phycoerythrinuntereinheiten aus Fremyella diplosiphon für die α -Kette einen Wert von 18 300 Dalton und für die schwerere β -Kette einen Wert von 20 000 Dalton. GLAZER und COHEN-BAZIRE (48) bestimmten mit ähnlichen Methoden die Molekulargewichte der Untereinheiten eines C-Phycoerythrins aus einer Aphanocapsa species zu 20 000

(α -Kette) und 22 000 (β -Kette). O'CARRA und KILLILEA (94) wiederum bestimmten die C-Phycoerythrinuntereinheiten aus Phormidium persicinum mit 19 700 (α -Kette) und 22 000 (β -Kette). Einheitlich beruhen die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen von Untereinheiten auf der SDS-Gelelektrophorese. Während GLAZER/COHEN-BAZIRE (48) und BENNETT/BOGORAD (5) hierzu die nativen Proteine verwendeten, bestimmten O'CARRA/KILLILEA (94) die reduzierten S-Carboxymethylderivate der Proteine. Auffälliger sind die Unterschiede bei C-Phycocyaninuntereinheiten. O'CARRA und KILLILEA (94) fanden mit ihrer Methode bei fünf nur Phycocyanin synthetisierenden Cyanobakterienspecies ein Molekulargewicht von 18 500 für die α -Kette und 20 500 für die β -Kette. Aufgrund von Aminosäureanalysen der Untereinheiten und Gelfiltration ermittelten KOBAYASHI et al. (66) für das Phycocyanin aus Phormidium luridum Molekulargewichte von 11 900 (α -Kette) und 18 500 (β -Kette). TORJESEN und SLETTEN (115) beschrieben das Molekulargewicht der Untereinheiten des Oscillatoria agardhii C-Phycocyanins mit α -Kette : 12 200 und β -Kette : 14 100, wobei eine säulenchromatographische Trennung bei 40° C durchgeführt wurde.

1.4. Immunologie

Zur genaueren Charakterisierung der C-Phycoerythrine und deren Proteolyseprodukte wurden immunologische Methoden herangezogen. Bisher beschriebene Untersuchungen zur Verwandtschaft von Biliproteiden beschränken sich meist auf die Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY. So immunisierte BERNIS (7) Kaninchen mit Biliproteiden aus Rotalgen, Cyanobakterien und Cryptophyten. Mit Hilfe der gewonnenen Seren untersuchte er im Ouchterlonytest die antigene und immunologische Beziehung der Biliproteide untereinander. C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin zeigen keine immunologische Kreuzreaktion, was inzwischen mehrfach bestätigt werden konnte. So wiesen GLAZER et al. (50) nach, daß selbst die Biliproteide aus einem Organismus (Allophycocyanin, C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin) nicht verwandt sind. Die von BERNIS gefundene Ver-

wandschaft zwischen Phycocyanin und Allophycocyanin wurde von GLAZER et al. (50) und COHEN-BAZIRE/BEGUIN (20) widerlegt. Dar- aus schließt TAKEMOTO (112), daß die chromophoren Gruppen dieser Biliproteide nicht immunogen sind, da sie nach CHAPMAN (19) identische Chromophore besitzen. Eine von BERNS gefundene enge Verwandschaft der Phycocyanine konnte von GLAZER/HIXSON (49) bestätigt werden. So ergab das R-Phycocyanin aus Porphyridium cruentum mit einem C-Phycocyanin-Antiserum eine starke Kreuz- reaktion. Auch Phycoerythrocyanin gehört zu der immunologischen Gruppe der Phycocyanine (17). Nach GLAZER et al. (50) besitzen Cryptomonaden-Phycoerythrine keine Beziehung zu Rotalgen und Cyanobakterien-Phycoerythrinen. Jedoch beschrieben MAC COLL et al. (79) eine Präzipitation von Porphyridium cruentum Phyco- erythrin mit einem Antiserum gegen Phycoerythrin von Rhodomonas lens. Hinsichtlich der Cryptomonaden-Phycocyanine zeigen die Untersuchungen von BERNS (7) keine Verwandschaft mit Rotalgen- und Blaualgen-Phycocyaninen. Auffallend jedoch sind die zum Teil von BERNS erhaltenen mehrfachen Präzipitationsbanden der unter- suchten Biliproteide im Ouchterlonytest. Hierbei dürfte es sich um bereits proteolytisch degradierte Proteine handeln (vgl. S. 51).

1.5. Chromatische Adaptation

Bei einigen Cyanobakterien ist eine deutliche Veränderung im Gehalt von C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin, je nach einge- strahlter Wellenlänge des Lichtes, festzustellen. Dieses Phäno- men bezeichnet man als chromatische Adaptation (35,42). Der Sinn der komplementären Adaptation besteht darin, daß bei einer gege- benen Lichtqualität durch eine Farbanpassung der maximale Assi- milationseffekt erzielt wird (38). Die Blaualgen bilden im mono- chromatischen Licht verstärkt die Biliproteide, die das einfal- lende Licht maximal absorbieren. So wird bei Grünlichteinstrah- lung mehr Phycoerythrin synthetisiert. Daher sind die Lager der Blaualgen in den Tiefen der Gewässer, wo durch selektive Licht- absorption blaugrünes Licht herrscht, rot oder violett gefärbt.

Die Untersuchungen von GAIDUKOV (43),BORESCH (14) und HARDER (57) beruhen in erster Linie auf Beobachtungen von Algen auf Agarnährböden bei direkter Lichteinstrahlung. Somit konnte die Adaptation einer Blaualge nur dann festgestellt werden, wenn sie sich direkt verfärbte. Geringere Schwankungen im Phycoerythrin-Phycocyaninverhältnis waren hiermit nicht festzustellen.

1.6. Problemstellung

Ziel der Arbeit war der Vergleich von C-Phycoerythrin innerhalb der Cyanobakteriensystematik anhand physikalischer und immunochemischer Kriterien bei analytisch gleichen Methoden. Die bisher in der Literatur beschriebenen Biliproteide sind aufgrund obiger Ausführungen zum Teil nicht direkt vergleichbar, da sich die angewandten Methoden von Autor zu Autor unterscheiden. Ausgehend von dem Phycoerythrin einer neuen, selbstisolierten Algenspecies sollte dieses durch Elektrophorese, pI-Wert und insbesondere immunologische Methoden mit den Phycoerythrinen anderer Blaualgen verglichen werden. Gleichzeitig wurde, aufgrund der Adaptation verschiedener Blaualgen, die Veränderung des Phycoerythrin-Phycocyaninverhältnisses bei Rot- und Grünlichteinstrahlung untersucht. Ferner sollte die Anordnung der Thylakoide bei verschiedenen Algen charakterisiert werden.

2. Vergleichende Untersuchungen von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien,bezogen auf die Biliproteide einer selbstisolierten Species

2.1. Isolierung einer C-Phycoerythrin synthetisierenden Alge

Am 27. November 1973 isolierten wir aus dem Wasserpflanzenbeet der subtropischen Pflanze "Altanthera philoxeroides" eine Alge. Das 40 x 40 cm große Beet lag in östlicher Richtung in einem der Gewächshäuser des Botanischen Gartens in München. Die durchschnittliche Temperatur betrug 30° C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 %. Während der Isolierung wurden keine chemischen Hilfsmittel eingesetzt (114), um den Organismus nicht zu schädigen oder Mutanten hervorzurufen. Da die mikroskopische Betrachtung der entnommenen schleimigen Algenklumpen eine Vielzahl von Algen, Flagellaten und Bakterien ergab, versuchten wir durch verschiedene Vorbehandlungen eine bereits grobe Trennung der Organismen zu erreichen. Die hierfür verwendeten Methoden entnahmen wir einer Anleitung bei PRINGSHEIM (104), wobei zunächst besondere Sorgfalt auf die Verminderung der Bakterien gelegt wurde. Bei der eigentlichen Isolierung wurde in zwei Schritten verfahren. Die bei den Flüssigkulturen auf der Mediumoberfläche schwimmenden jungen Zellfäden wurden abgeimpft und auf Agarplatten übertragen. Schon nach wenigen Stunden war auf der Agarfläche bei einer schmutziggrün bis braun gefärbten Alge eine starke Kriechbewegung festzustellen, die auch nach halbseitigem Abdunkeln der Agarplatte gleichmäßig erhalten blieb. Diese gleitenden Trichome nutzten wir zur Trennung von anderen Algen (13,110). Die Alge erhielt die Stamm-Nummer W 1173.

2.1.1. Systematik der Blaualgen

Die in der Literatur (26,16) aufgeführte Blaualgensystematik umfaßt zwei Klassen mit insgesamt fünf Ordnungen. Die erste Klasse - Chroococcophyceae - enthält drei Ordnungen: Chroococcales, Pleurocapsales und Chamaesiphonales. Chroococcales

und Chamaesiphonales haben Einzelzellen als gemeinsames Merkmal, wobei die erstere Ordnung nicht in Basis und Spitze differenzierbar ist. Diese Unterscheidung ist bereits bei den Chamaesiphonales erkennbar. Die pleurocapsalen Blaualgen sind fadenförmig, ohne Differenzierung in Trichome und Filamente, außerdem haben sie coccoide Strukturen.

Die zweite Klasse - Hormogoniophyceae - setzt sich aus zwei Ordnungen zusammen: Nostocales und Stigonematales. Gelegentlich werden diese beiden Ordnungen unter dem Begriff Hormogonales (38) zusammengefaßt. Kennzeichen für diese Algen sind Trichome und Filamente mit hormogonaler Organisation. Weiterhin kommen in beiden Fällen Hormogonien, Heterocysten und Akineten vor. Der kennzeichnende Unterschied zwischen Nostocales und Stigonematales besteht im Typ der Verzweigung ihrer Fäden. Das Kennzeichen für die Nostocales ist keine oder eine unechte oder falsche Verzweigung, wohingegen die Stigonematales eine echte oder dichotome Verzweigung mit heterotrichen Organisationsstufen aufweisen.

2.1.2. Mikroskopische Bestimmung der isolierten Algenspecies

Die Bestimmung der Alge erfolgte aufgrund morphologischer Merkmale. Aufgrund der Zellformen konnten die Ordnungen der ersten Klasse (Chroococcophyceae) sicher ausgeschlossen werden. Der Beweis, daß es sich um eine nostocale Form handelt wurde durch die Beobachtung folgender Kriterien erbracht: Sehr viele Filamente, Trichome und Hormogonien, Fäden ohne jegliche Verzweigung. Die Merkmale zur Einordnung der Gattung entnahm man dem Bestimmungsschlüssel von BOURRELLY (16). Die Trichome haben keine feste Schleimscheide und die einzelnen Zellen der Fäden hängen nicht direkt zusammen, sondern sind durch Gelatinebrücken miteinander verbunden. Letzteres Kriterium ist ein deutlicher Hinweis für die Gattung - Pseudanabaena -. Die endgültige Zuordnung zur Gattung Pseudanabaena wird durch vier weitere Merkmale gestützt: Sehr bewegliche Filamente ohne Scheide, keine Heterocysten, keine Akineten, zwischen den Zellen Gelatinebrücken. LAUTERBORN (72)

rechtfertigte mit diesen Merkmalen im Jahre 1916 die Aufstellung der bis dahin neuen Gattung *Pseudanabaena*. Gleichzeitig beschrieb er eine neue Species - *Pseudanabaena catenata* -. Diese Species kommt von den in der Literatur beschriebenen Species unserer am nächsten.

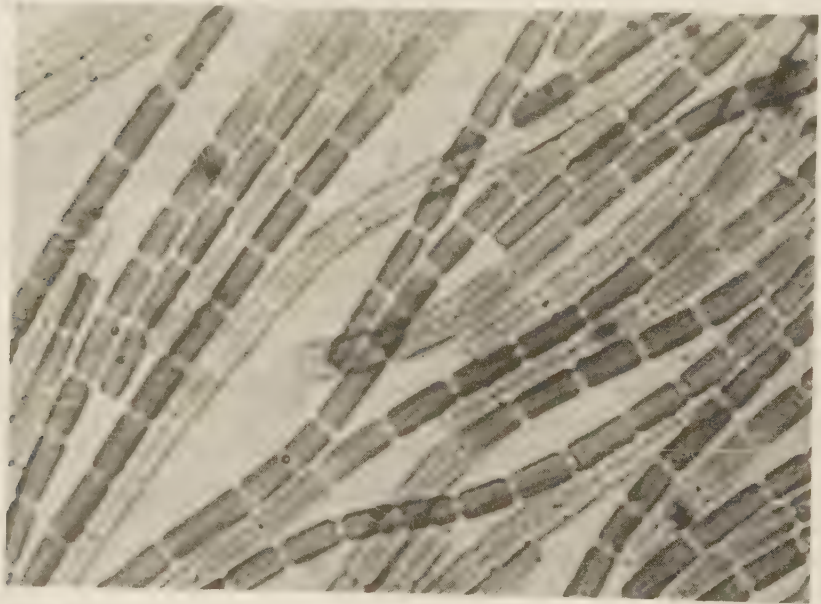


Abb. 3: *Pseudanabaena* Stamm W 1173, selbstisoliert (400 x).

2.1.3. Vergleich von *Pseudanabaena* Stamm W 1173 mit *Pseudanabaena catenata*

Um eine genauere Untersuchung der beiden Species durchführen zu können, verglichen wir unseren isolierten Organismus mit authentischer *Pseudanabaena catenata* (Stamm-Nr. B 1464-1, Kultursammlung Göttingen). Völlig identisch sind die Ausmaße und die Form der Zellen im Filament: 2 μ breit, 3 - 5 μ lang, zylindrisch

und an beiden Seiten abgerundet. Lediglich die Farben der beiden Algen sind verschieden. Unsere Species ist fast ausschließlich braun, Pseudanabaena catenata dagegen ist schmutziggrün. Weiterhin war die Intensität der Kriechbewegungen auf dem Agarnährboden von Pseudanabaena catenata weit weniger intensiv. Ein wesentlicher Unterschied der beiden Species bestand im Adaptationsverhalten. Unsere Alge adaptierte nicht, während Pseudanabaena catenata im Grünlicht Phycoerythrin und Phycocyanin, im Rotlicht dagegen nur noch Phycocyanin synthetisierte (vgl. S. 88).

2.2. Anzucht und Aufschluß verschiedener Algen

Da die Biliproteide von Pseudanabaena Stamm W 1173 mit denen bekannter Algen verglichen werden sollten, mußten verschiedene Algen zur Gewinnung der Pigmente kultiviert werden (Übersicht in Tabelle 1, S. 12). Die Kultivierung erfolgte:

1. auf den von Prof. Dr. D. J. CHAPMAN angegebenen Medien mit den Bezeichnungen A, D, Z. Medium Z entspricht einer leicht veränderten Zusammensetzung nach ZEHNDER (122). Nährsalzlösung D ist ein Seewassermedium, das vor dem Autoklavieren auf pH 7,5 eingestellt werden mußte.
2. auf dem von Prof. Dr. W. NULTSCH angegebenen Medium, welches einer von DREWS (30) modifizierten Nährlösung nach Pieper entspricht.
3. auf B I₁, was der Nährlösung C bei KRATZ und MYERS (69) entspricht, jedoch ohne Natriumcitrat (Zusammensetzung der Medien vgl. S. 107).

Die Aphanocapsa species 6701 wuchs bei uns nicht auf dem von STANIER et al. (110) angegebenen Medium BG 11, wohl aber auf unseren Medien A und B I₁. Eine C-Quelle enthielt nur das von NULTSCH angegebene Medium für die Phormidium-Arten, Anabaena variabilis und einer Lyngbya.

Die Algen wurden entweder in Weißlicht, Rotlicht oder Grünlicht angezogen. Ein Vergleich der erhaltenen Frischgewichte im Rotlicht und Grünlicht, bei ansonsten gleichen Anzuchtbedingungen,

Tabelle 1: Übersicht der Algen, die zum Vergleich von Phycoerythrin und Phycocyanin kultiviert wurden.

Ordnung	Familie	Algen
Chroococcales		Anacystis nidulans Aphanocapsa 6701
Pleurocapsales	Hyellaceae	Dermocarpa violaceae
Nostocales	Scytonemataceae	Plectonema boryanum Tolypothrix tenuis
	Microchaetaceae	Fremyella diplosiphon
	Rivulariaceae	Calothrix membranaceae Calothrix parietina Anabaena variabilis
	Nostocaceae	Nostoc muscorum A
	Oscillatoriaceae	Oscillatoria rubescens Lyngbya (C39) Phormidium (C8) Phormidium (C18) Phormidium ambiguum (C7) Phormidium autumnale (C5) Phormidium persicinum Pseudanabaena catenata Pseudanabaena W 1173

ist aus Tabelle 2, S. 14 zu ersehen. Bei drei Algen, die nur Phyco-
cyanin synthetisieren, zeigte sich im Rotlicht ein deutlich
stärkeres Wachstum. Dagegen findet man bei den meisten noch zu-
sätzlich Phycoerythrin produzierenden Algen ein stärkeres
Wachstum im Grünlicht. Ausnahmen machten Tolypothrix tenuis und
Calothrix parietina. Bei den übrigen Arten ergibt sich kein er-
kennbarer Unterschied des Rot- und Grünlichtwachstums.

2.2.1. Wahl einer geeigneten Zellaufschlußmethode

Beim Aufschluß der Algenzellen kam es darauf an, ein Verfahren
zu wählen, das die Biliproteinaggregate möglichst schnell und
schonend von der Thylakoidmembran ablöst, ohne sie zu verän-
dern. Grundsätzlich wurden die aufgebrochenen Zellen sofort mit
frischem, kalten Puffer eluiert und zentrifugiert. Weiterhin war
es notwendig, daß die aufgebrochenen Zellen möglichst schnell
von dem Rohextrakt getrennt wurden. Denn es zeigte sich, daß
C-Phycoerythrin durch Inkubation mit dem Rückstand aufgebro-
chener Zellen unserer Pseudanabaena W 1173 eine spektrale Ver-
änderung ergab, was auf Proteolyse schließen ließ (vgl. Kap. 3).
Enzymatische Zellaufschlußmethoden, wie sie in der Literatur von
LEE et al. (73), KAO et al. (65) und BIGGINS (10) beschrieben
sind, haben den Nachteil, daß die Enzyme, selbst wenn sie keinen
Einfluß auf die Biliproteide haben, längere Zeit auf die Zellen
einwirken müssen. Zudem werden gleichfalls Bakterienzellen von
nicht axenischen Algenkulturen mit aufgeschlossen, austretende
Enzyme könnten somit speziell das Phycoerythrin verändern.
Eine weitere sehr häufig angewandte Methode besteht im mehrma-
ligen, langsamen Einfrieren und Auftauen der Algenzellen, wobei
die sich bildenden Eiskristalle die Zellen perforieren und die
Biliproteide daraus eluiert werden können (18). Mit dieser Me-
thode wurde versuchsweise Pseudanabaena Stamm W 1173 aufge-
schlossen. Hierbei zeigte sich jedoch, daß je nach Häufigkeit des
Prozesses der entstandene Extrakt alterte, was mit dem in Abb. 7
dargestellten Laufschemata nach gelelektrophoretischer Auftren-
nung vergleichbar war. Ein weiterer Nachteil bestand darin, daß

Tabelle 2: Ausbeuten verschiedener Algen im Rotlicht (5000 erg/cm²/sec.) und Grünlicht (5500 erg/cm²/sec.) angeimpft mit ca. 0,5-0,8 g Alge auf 2,5 l Nährmedium.

Alge	Wachstumsdauer Tage	Ausbeute/g	
		Rotlicht	Grünlicht
Anabaena variabilis	14	5,0	5,0
Anacystis nidulans	10	3,2	4,1*
Aphanocapsa 6701	10	2,0	2,0
Calothrix membranaceae	12	3,0	3,0
Calothrix parietina	12	4,0	3,0
Dermocarpa violaceae	25	1,1	2,0
Fremyella diplosiphon	11	1,5	5,5
Lyngbya species (C39)	20	1,0	1,0
Nostoc muscorum A	10	4,0	5,0
Oscillatoria rubescens	32	4,5	1,5*
Phormidium ambiguum (C7)	30	6,0	6,0
Phormidium autumnale (C5)	26	1,5	4,0
Phormidium persicinum	10	3,0	3,0
Phormidium species (C8)	20	3,0	3,0
Phormidium species (C18)	24	3,0	3,0
Plectonema boryanum	10	3,7	2,3*
Pseudanabaena catenata	10	1,7	3,0
Pseudanabaena W 1173	10	3,0	3,0
Tolypothrix tenuis	10	3,0	4,8

*) Algen, die nur Phycocyanin synthetisieren.

diese Methode nicht auf alle Algenspecies anwendbar war. So erhielten wir im Falle von Nostoc muscorum A keine ausreichende Ausbeute an Biliproteiden, da offensichtlich die Zellen mit dieser Methode nur geringfügig aufgeschlossen wurden.

Auch der Zellaufschluß mit Ultraschall ist möglich. Diese Methode hat aber zwei entscheidende Nachteile: Eine ausreichende Kühlung während der Beschallung erwies sich als schwierig. Weiterhin werden bei diesem Vorgang auch intrazelluläre Membransysteme zerstört. Freiwerdende Membranenzyme können somit direkt auf die Biliproteide einwirken. Auch hier zeigte der gelelektrophoretisch aufgetrennte Rohextrakt von nur fünf Minuten beschallten Algenzellen schon deutliche Spaltprodukte des Phycoerythrins.

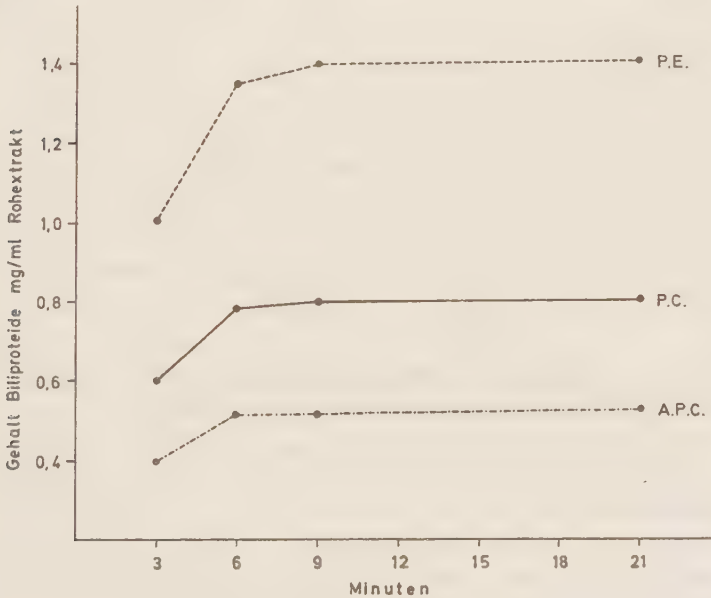


Abb. 4: Gehalt an Biliproteiden mg/ml von *Pseudanabaena* W 1173 Rohextrakt in Abhängigkeit der Aufbrechzeit.

Eine Methode, die in ausreichender Weise Kühlung und ein schnel-

les Aufbrechen der Algenzellen ermöglicht, besteht im mechanischen Aufschluß durch Glasperlen in der Zelmühle. Durch heftiges exzentrisches Schütteln in einem V₂A-Stahlbecher werden die zwischen den Glasperlen suspendierten Algenzellen durch Reibung aufgebrochen. Eine anschließende Elution mit kaltem Puffer enthält die Biliproteide. Während des Aufbrechens wird der Stahlbecher mit Wasser gekühlt. In der Regel waren zehn Minuten zum Aufbrechen der Zellen ausreichend. Eine eventuelle Verlängerung der Aufschlußzeit wurde aus Gründen der möglichen Erwärmung und der damit einhergehenden Schädigung der zu isolierenden Proteine vermieden. Wie aus dem Zelmühlendiagramm in Abbildung 4 zu ersehen ist, erbrachte die Verdoppelung der Aufschlußzeit eine unwesentliche Erhöhung der Ausbeute von Phycoerythrin und Phycocyanin.

2.2.2. Herstellung der Rohextrakte

Alle Algenrohextrakte wurden durch Elution der aufgebrochenen Algenzellen mit kaltem 0,1M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 hergestellt. Zunächst wurde durch eine grobe Zentrifugation von den Glasperlen getrennt. Der Überstand wurde sodann ultrazentrifugiert, um Membranpartikel (erkennbar am membrangebundenen Chlorophyll) aus dem Extrakt zu sedimentieren.

2.3. Physikalisch-chemische Untersuchungen an C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyanobakterien

2.3.1. Elektrophoretische Untersuchung verschiedener Blaualgenrohextrakte

Biosystematische Vergleichskriterien der Biliproteide von Rotalgen und Cyanobakterien beschränken sich meist auf spektrale Absorptionstypen der Proteinanteile. Demnach unterscheidet man (93) zwischen C-Phycoerythrin (560 - 564 nm), B-Phycoerythrin (z 546 nm, 565 nm), R-Phycoerythrin (z 498 nm, 540 nm und 568 nm) und Cryptomonadenphycoerythrin Typ I (544 nm), Typ II (556 nm)

und Typ III (565 nm).

Bei den Phycocyaninen unterscheidet man zwischen C-Phycocyanin (≈ 615 nm), R-Phycocyanin (≈ 553 nm, 618 nm) und Cryptomonaden-phycocyaninen Typ I (≈ 585 nm, 615 nm), Typ II (≈ 585 nm, 650 nm) und Typ III (≈ 585 nm, 625 - 630 nm).

Angeregt durch die spektralen Untersuchungen von HIROSE et al. (62,63) bei Rot- und Blaualgen, versuchten MALLERY und RICHARDSON (81) durch disk-elektrophoretische Untersuchung der Rohextrakte von elf Rotalgenarten eine weitere biosystematische Vergleichsmöglichkeit zu schaffen. Aufgrund der relativen Mobilitätswerte der Phycoerythrinzonen kamen die Autoren zu dem Schluß, daß diese Pigmente eine größere Heterogenität besitzen, als zuvor angenommen.

Da die akzessorischen Pigmente der Cyanobakterien Proteine sind, wandern sie bei angelegter Spannung im elektrischen Feld (84). Verantwortlich für saure oder basische Eigenschaften eines Proteins sind die geladenen Gruppen der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren, insbesondere von Glutaminsäure, Asparaginsäure bzw. Lysin, Arginin und Histidin. Die Bewegungskraft, die auf die Proteine im homogenen elektrischen Feld einwirkt, ist abhängig von der Ladung der Proteine und der Größe der elektrischen Feldstärke. Bei ihrer Bewegung in der Flüssigkeit haben die geladenen Teilchen einen Reibungswiderstand zu überwinden (Stoke'sches Gesetz) (84). Die Wanderung eines Proteins ist einerseits abhängig von seiner Eigenschaft wie Größe, Vorzeichen seiner Ladung, Konfiguration und Konzentration, andererseits von den Eigenschaften des umgebenden Milieus wie Ionenstärke, Viskosität, Temperatur und pH der Elektrolytflüssigkeit. Der durch den gewählten pH-Wert gegebene Dissoziationsgrad der schwachen Säure, Base oder amphoteren Verbindung ist verantwortlich für die Ionennettoladung und damit für die Beweglichkeit. Sie ergibt sich als Quotient aus Geschwindigkeit und Feldstärke (84). Die oben genannten Parameter gelten sowohl für die freie, als auch für die Trägerelektrophorese.

Bei der von uns verwendeten Polyacrylamid-Gelelektrophorese haben die nach Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid ent-

standenen Poren noch einen Siebeffekt, durch den die Moleküle außer der Ladung auch hinsichtlich ihrer Größe und Tertiärstruktur getrennt werden.

Zunächst wurde versucht anhand der Pseudanabaena W 1173 Rohextrakte die Auftrennung der Biliproteide zu optimieren (vgl. Abb. 5). Hierzu verwendete man die bei MAURER (84) und DAVIS (24) angegebenen, verschiedenen diskontinuierlichen Puffersysteme, bei gleichen Gelkonzentrationen (7,7 %). Es zeigte sich, daß das saure System ungeeignet war. Neben einer hohen Laufzeit (acht Stunden) war zwischen Phycoerythrin und Phycocyanin kaum eine Trennung erkennbar. Außerdem war eine starke Fluoreszenzabnahme von Phycoerythrin festzustellen, was auf eine Denaturierung schließen ließ.

Eine klare Trennung zwischen Phycoerythrin und Phycocyanin beobachteten wir bei den diskontinuierlichen Systemen von pH 7,6 und pH 8,8 im Trenngel bzw. von pH 7,4 und pH 8,3 im Elektrodenspuffer. Obwohl bei pH 7,6 bereits eine gute Trennung zu erkennen war, entschieden wir uns für pH 8,8, da bei dieser Wasserstoffionenkonzentration die Laufzeit von sechs auf vier Stunden, bei gleicher Stromstärke, verkürzt werden konnte. Die Erhöhung des Trenngelpuffers auf pH 9,8 ergab kein brauchbares Ergebnis, hier liefen die Biliproteide in sehr schmalen Zonen zusammen. Es lag die Vermutung nahe, daß bei diesem pH-Wert eine Schädigung der Proteine vorlag. Da die Phycocyaninchromophore in Gegenwart von Zinkionen sich verändern, wurde sowohl der Trenngelpuffer, als auch der Elektrodenspuffer mit 10 mM Titriplex III versetzt. Die in Abb. 6 angegebenen Mobilitätswerte von Phycoerythrin und Phycocyanin sind Relativwerte, bezogen auf Bromphenolblau.

Bei der Beurteilung der Laufschemen ergaben sich grundsätzlich vier Typen von Phycoerythrin und Phycocyanin synthetisierenden Blaualgen:

1. Phycocyanin wandert vor dem Phycoerythrin, dazwischen ist eine violette Bande zu beobachten, die bei Reelektrophorese in Phycocyanin und Phycoerythrin aufspaltet. Vor dem Phycocyanin beobachteten wir gelegentlich eine türkisfarbene Zone. Dieses Schema fanden wir bei Pseudanabaena W 1173, Pseud-

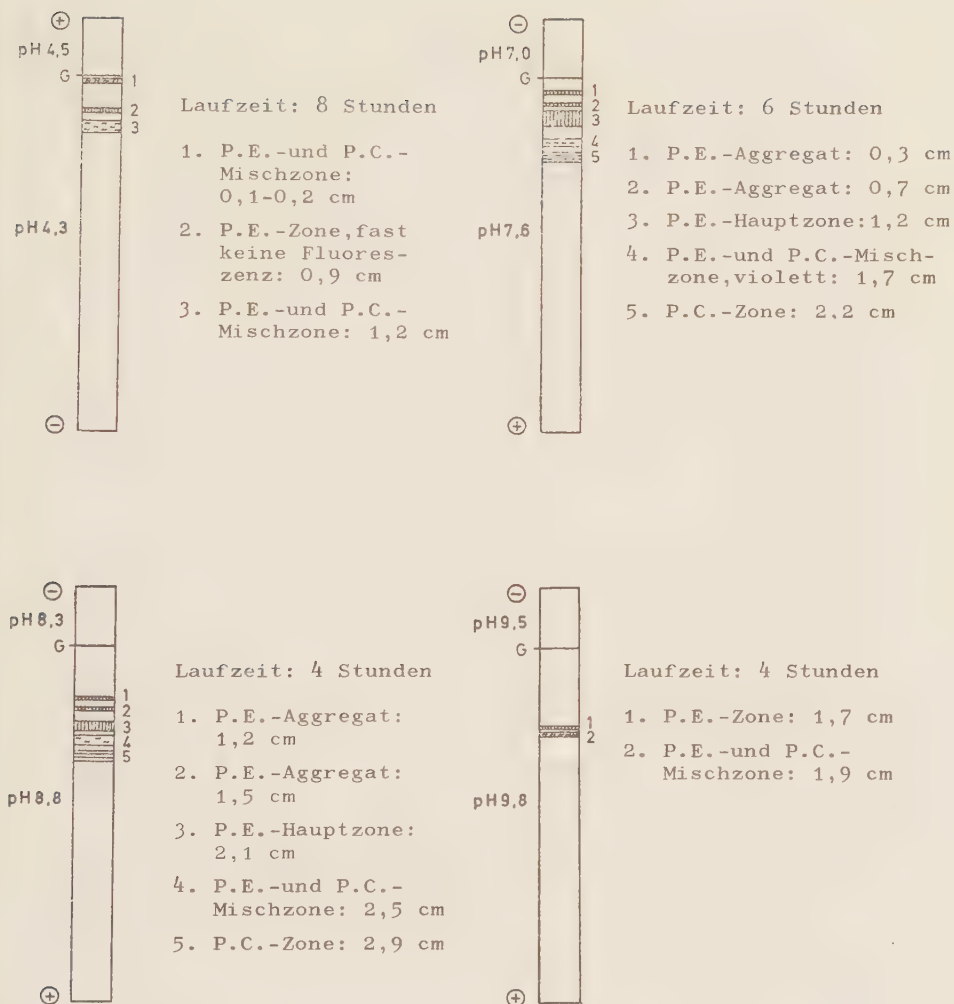


Abb. 5: Auftrennschema des Pseudanabaena W 1173 Rohextraktes auf 7,7 % Acrylamidgelen, bei verschiedenen pH-Werten. Die oberen pH-Werte gelten für den Elektrodenpuffer; die unteren für den Trenngelpuffer. Die in cm angegebenen Werte stellen die Wanderstrecken der Zonen ab der Gelgrenze dar. G = Gelgrenze.

- anabaena catenata, Freymyella diplosiphon und Tolypothrix tenuis. Analytisch unterschied sich das Laufschemata des Rohextraktes unserer isolierten Species von allen anderen durch zwei aufeinanderfolgende Phycoerythrinzonen über der Phycoerythrinhauptbande. Hierbei muß man annehmen, daß es sich um Phycoerythrinaggregate handelt: Nach Elution mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 wandern die Produkte bei einer weiteren Elektrophorese in der Hauptbande. In diesem Typ besitzen die Phycoerythrine die niedrigste Mobilität (M_B = bezogen auf Bromphenolblau 0,34 - 0,38).
2. Bei der Lyngbya C 39 und Phormidium autumnale unterscheiden sich die Mobilitäten des Phycoerythrins (0,41 - 0,46) schon deutlich von denen der ersten Gruppe. Bei Phormidium autumnale (C5) beobachteten wir bei der Mobilität 0,5 eine weitere Mischzone. Phycocyanin wurde nicht abgetrennt.
 3. Phycoerythrin wandert vor dem Phycocyanin. Diesen Typ fanden wir bei Dermocarpa violaceae, Anabaena variabilis, Calothrix parietina und Phormidium persicinum. Hier ergaben sich die höchsten Mobilitätswerte für das Phycoerythrin ($\approx 0,48$). Die Bande mit der Mobilität 0,62, die bei dem Phycoerythrin aus Phormidium persicinum gefunden wird, besteht nach dem Elektronenspektrum aus proteolytisch abgebautem Biliprotein (vgl. S. 53) und darf demnach nicht zum Vergleich herangezogen werden.
 4. Bei der Aphanocapsa 6701 und Calothrix membranaceae beobachtete man keine klare Trennung von Phycoerythrin und Phycocyanin. Hier liefen die aufgespaltenen Phycocyanine in der breit wandernden Phycoerythrinbande. Mobilitätswerte konnten demnach nicht ermittelt werden.

Die Notwendigkeit, Mobilitätsergebnisse nur aus dem frischen Rohextrakt abzuleiten, ließ sich anhand des elektrophoretischen Laufschemas von einem frisch hergestellten und einem gealterten Pseudanabaena W 1173 Rohextrakt (Abb. 7) zeigen. Offensichtlich besteht die Alterung im wesentlichen aus einer Proteolyse, wobei sowohl die Mobilität der Hauptzone zunimmt als auch schneller wandernde Bruchstücke auftreten. Außerdem sind im gealterten

Rohextrakt die beiden Phycoerythrinaggregate nicht mehr zu finden.

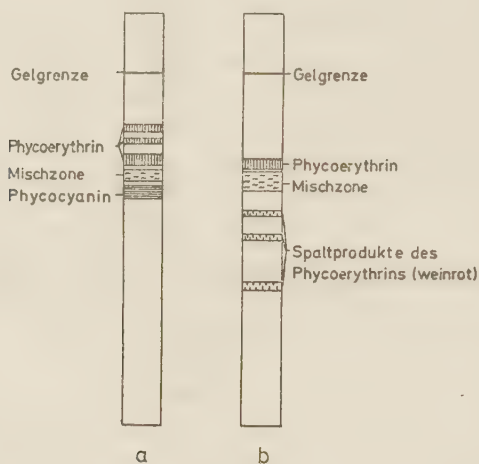


Abb. 7: Elektrophoretisch aufgetrennte Rohextrakte von *Pseudanabaena* W 1173 (Verdünnung 1:10). Aufgetragen wurden je 0,1 ml; a) frischer Rohextrakt, b) gealterter Rohextrakt (Zimmertemperatur - drei Tage).

Bei allen untersuchten Algen findet man spezifische Muster der Biliproteidverteilung. Zusammenhänge des Verteilungsmusters mit der taxonomischen Stellung sind nicht ohne weiteres erkennbar. So findet man durchweg zwei Phycocyaninbanden, nur bei *Nostoc muscorum* A und *Phormidium autumnale* (Oscillatoriaceae) und *Dermocarpa violaceae* (Hyellaceae) tritt jeweils nur eine Phycocyaninbande auf. Mit einer Zunahme der Mobilität von Phycoerythrin (Typen 1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 3) nimmt allgemein auch die Mobilität von Phycocyanin zu; eine Ausnahme hiervon findet sich lediglich bei *Phormidium persicinum* und bei *Dermocarpa violaceae*, die Phycocyaninbanden geringerer Mobilität besitzen. *Dermocarpa violaceae* nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als es das Phycoerythrin mit der größten und das Phycocyanin mit der kleinsten Mobilität

besitzt. Da nur eine Species der Pleurocapsales untersucht wurde, kann noch nicht gesagt werden, ob das charakteristisch für diese Ordnung ist.

Die von MALLERY et al. (81) gewählten Disk-Elektrophoresebedingungen sind mit den unsrigen durchaus vergleichbar. Unwesentliche Unterschiede bestehen im Trenngelpuffer pH 8,8 (8,9), in der Gelkonzentration 7,7 % (7,0) und in der Laufzeit 4 Stunden ($2\frac{1}{2}$ Stunden). Bei den von MALLERY untersuchten Rotalgenspecies ist auch hier die überwiegende Tendenz zu erkennen, daß die Phycocyanine vor den Phycoerythrinbanden wandern. Allerdings fanden die Autoren von elf untersuchten Rotalgen nur bei fünf Species Phycocyanin. Eine Ausnahme machte nur eine Ceramium species, bei der das Phycocyanin einen geringeren Mobilitätswert hatte, vergleichbar mit den Cyanobakterienspecies Phormidium persicinum und Dermocarpa violaceae. Im Schnitt findet MALLERY bei den untersuchten Rotalgen vier Phycoerythrinzonen. Inwieweit es sich bei den erhöhten Phycoerythrinmobilitätswerten um proteolytisch veränderte Zonen handelt, wurde von den Autoren nicht besprochen, dasselbe gilt für mögliche Aggregationen über den Hauptbanden. Wenn man davon ausgeht, daß die von uns gefundenen Mischzonen Phycoerythrin und Phycocyanin enthalten, so finden wir bei den Cyanobakterien höchstens zwei bis drei Phycoerythrinzonen, mit Ausnahme von Pseudanabaena W 1173 allerdings vier. Bei der Beurteilung ihrer Laufschemen und Mobilitätswerte begutachteten sie nur die Hauptzone. So fanden sie aufgrund der Phycoerythrinmobilitäten deutliche Unterschiede zwischen den Bangiophyceae und den Florideophyceae. Da die Florideophyceae eine höhere Entwicklungsstufe darstellen, interpretieren die Autoren, bei gleichzeitiger Zunahme der Phycoerythrinmobilität eine molekulare Evolution. Auch Arten, die spektralidentisches B-Phycoerythrin synthetisieren, werden mit Hilfe der Elektrophorese innerhalb einer Ordnung unterschieden. Auffallend ist, daß bei ihren Elektrophoresen keine Mischzonen zwischen Phycoerythrin und Phycocyanin auftreten. Eine mögliche Erklärung liegt darin, daß in den Rotalgen die Biliproteide höher aggregiert sind und somit keine Mischaggregate von Phycoerythrin und Phycocyanin auftreten.

Zur Betrachtung einer möglichen Evolution des Phycoerythrins innerhalb der Cyanobakterien muß man von den Chroococcalen zu den Nostocalen gehen. Da die chroococcale Aphanocapsa 6701 nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Rohextraktes keine eindeutigen Zonen bildet, kann sie zu einer derartigen Betrachtung nicht herangezogen werden. Eine nähere Betrachtung kann von uns nur innerhalb der Nostocales angestellt werden. Eine deutliche Heterogenität, sowohl des Phycoerythrins als auch des Phycocyanins stellten wir schon innerhalb der Familie der Oscillatoriaceen fest. So unterscheiden sich die *Phormidium*- und *Lyngbya*-Species deutlich von den beiden *Pseudanabaena*-Arten. Andererseits kann *Tolypothrix tenuis* der Scytonemataceae mit *Nostoc muscorum* A der Nostocaceae verglichen werden. Eine Sonderstellung nimmt hier nur die Microchaete *Fremyella diplosiphon* ein.

2.3.2. Isolelektrische Fokussierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyanobakterien

Wie im vorhergegangenen Kapitel aufgeführt, haben sowohl Ladung als auch Molekülgröße einen Einfluß auf die elektrophoretische Mobilität. Eine Erhöhung der Mobilität durch Vergrößerung der Nettoladung kann dabei durch eine Erniedrigung der Mobilität aufgrund eines höheren Molekulargewichts kompensiert werden. Es schien daher sinnvoll, die Nettoladung mittels einer anderen Methode zu bestimmen.

Die isoelektrische Fokussierung (77) ist eine Methode, durch die Proteine oder Ampholyte aufgrund ihres isoelektrischen Punktes in einem pH-Gradienten aufgetrennt werden. Diese isoelektrischen Punkte stellen pH-Werte dar, bei denen die Nettoladung der Proteine oder Ampholyte Null ist. Sie wandern dann im elektrischen Feld nicht mehr. Wenn ein Protein in einen pH-Bereich kommt, der saurer ist als sein pI-Wert, so wird es protoniert und wandert im elektrischen Feld zur Kathode. Wenn der pH-Bereich basischer ist als der pI-Wert, so gibt es umgekehrt Protonen ab und wandert zur Anode. Eine bei der Elektrofokussierung gegenwirkende Kraft ist die Diffusion. Der Diffusionskoeffizient ist umge-

kehrt proportional dem Molekulargewicht des zu fokussierenden Proteins. Somit ergibt die Fokussierung bei Molekülen mit höherem Molekulargewicht bessere Ergebnisse. Der notwendige pH-Gradient wird durch Ampholytmoleküle (aliphatische Polyamino-Polycarbonsäuren) aufgebaut. Da die Ampholyte Mischungen mit sehr kleinen Differenzen ihrer pI-Werte sind, wandern sie im elektrischen Feld so lange, bis sie ihren jeweiligen Neutralpunkt erreicht haben. Positiv geladene Ampholytkationen wandern zur basischen Kathode, negativ geladene Ampholytionen wandern zur sauren Anode. Der so aufgebaute Gradient hat den niedrigsten pH-Wert an der Anode und den höchsten an der Kathode.

Die isoelektrische Fokussierung wurde auf Polyacrylamidgelen im mikroanalytischen Maßstab nach einer Methode von WRIGLEY (121) durchgeführt. Gelzusammensetzung und Arbeitsmethode entsprachen einem bei GLAZER et al. (51) beschriebenen Verfahren mit verschiedenen Abänderungen. Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte der isolierten Biliproteide war es zunächst notwendig, den pH-Gradienten in den Gelröhrchen zu bestimmen. Dazu wurden die herausgelösten Gele in 1 cm lange Abschnitte geteilt und der pH-Wert im Eluat bestimmt. Die Laufstrecke der Proteine, gemessen in cm, wurde in den Gradienten eingetragen und der pH-Wert abgelesen. Es zeigte sich, daß nach einem zweistündigen Lauf ein nicht linearer, aber kontinuierlicher Gradient vorlag. Versuche mit kürzeren Laufzeiten (45 - 60 Minuten) ergaben diskontinuierliche Gradienten, wobei die isoelektrischen Punkte scheinbar niedriger lagen (Abb. 8).

Grundsätzliche Unterschiede im Vergleich mit den pI-Werten der Literatur von C-Phycocyanin und C-Phycocerythrin lagen im pH-Bereich. Die Literaturwerte (48), sofern man sie überhaupt vergleichen kann, liegen um eine pH-Einheit unter den von uns gefundenen Werten. Eine mögliche Erklärung liegt generell in der Methode und dem von uns verwendeten pH-Bereich des Trägerampholyten (2 - 11). Dieser Bereich wurde gewählt, um auch eventuelle Spaltprodukte der Proteine zu erfassen.

Die in Tabelle 3 aufgeführten isoelektrischen Punkte zeigen, daß

die auf der Disk-Elektrophorese einheitlich wandernden Phycoerythrin- und Phycocyaninzonen in einem pH-Gradienten eine größere Ladungsheterogenität besitzen. Inwieweit es sich hierbei um eventuelle Isoproteine handelt, wurde nicht untersucht. Derartige Proteinformen sind nur bei einem B-Phycoerythrin aus Rhodella violaceae beschrieben (68). Keine Aufspaltung erhielten wir lediglich bei den elektrophoretisch isolierten Phycocyanin-zonen von Anacystis nidulans und Plectonema boryanum. Mit Ausnahme von Fremyella diplosiphon und dem proteolytisch abgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin beobachteten wir entweder eine Aufspaltung im Verhältnis 1 : 1, was bei den Phycocyaninen durchweg der Fall war, oder neben einer Hauptzone waren schwächere Nebenzonen zu erkennen. Das Nostoc muscorum A Phycocyanin ergab nach Fokussierung das gleiche Bild wie auf der Tris-Glycin-Elektrophorese, wo eine türkisfarbene Zone der blauen vorauslief und sich deutlich im pI-Wert unterschied.

Der Vergleich der isoelektrischen Punkte innerhalb der nach den Phycoerythrinmobilitäten aufgestellten Gruppen verdeutlicht, daß bei der Elektrophorese neben der Nettoladung auch ein molekularer Siebeffekt besteht. So sind in der ersten Gruppe die identischen Mobilitäten von Pseudanabaena catenata und Tolypothrix tenuis mit den gefundenen pI-Werten vergleichbar. Andererseits besteht bei gleichen Mobilitäten der Phycoerythrinzonen von Nostoc muscorum A und Pseudanabaena W 1173 ein deutlicher Unterschied ihrer pI-Werte. Demnach hätte das Nostoc Phycoerythrin ein kleineres Molekulargewicht. Eine Ausnahme in dieser Gruppe macht hier das Fremyella Phycoerythrin, das neben der geringsten Mobilität (0,34) in der Disk-Elektrophorese im pH-Gradienten die meisten Zonen aufweist, wobei die Hauptzone einen pI-Wert von 5,3 hat. Obwohl sich die disk-elektrophoretischen Mobilitäten der zweiten Gruppe (0,41 - 0,46) bereits deutlich unterscheiden, liegen hier sehr ähnliche isoelektrische Punkte vor. Im Falle der Lyngbya species muß auch hier eine geringere Molekülgröße diskutiert werden. Das Pigment mit einem isoelektrischen Punkt von 6,25 aus Phormidium autumnale (C5) ist mögli-

cherweise ein Spaltprodukt des Phycoerythrins, da derartig hohe Werte nur noch bei dem definierten Proteolyse-Phycoerythrin (PE II) aus Pseudanabaena W 1173 vorkommen. Auch die isoelektrischen Punkte der dritten Gruppe mit identischen Mobilitäten (0,48) sind sehr ähnlich. Offensichtlich hat die Beobachtung bei der Disk-Elektrophorese, daß hier die Phycoerythrine vor den Phycocyaninen wandern, nichts mit einem stark veränderten Ladungsunterschied zu tun. So sind zum Beispiel die pI-Werte von Tolypothrix tenuis (1. Gruppe) und Phormidium persicinum (3. Gruppe) völlig identisch. Nur einen geringen Unterschied in der Nettoladung fand man zwischen dem proteolytisch degradierten und dem intakten Phycoerythrin aus Phormidium persicinum.

Mit Ausnahme des Phycocyanins aus Nostoc muscorum A ergeben die übrigen Phycocyanine im Vergleich mit den Phycoerythrinen aus denselben Species höhere isoelektrische Punkte. Bei der Betrachtung der Phycocyanine von Algenspecies, die beide Biliproteide synthetisieren, ist auffallend, daß trotz hoher Mobilitätsschwankungen innerhalb der Phycocyanine (0,41 - 0,49) die isoelektrischen Punkte der zweiten Hauptzone fast identisch sind. Die Zone von Nostoc muscorum A mit dem pI-Wert von 6,96 muß wohl als abgebautes Spaltprodukt angesehen werden, denn ein Phycocyanin mit einem solch hohen Wert wurde sonst nicht gefunden.

Wie auf Seite 43 erwähnt, beobachteten wir insbesondere bei nur Phycocyanin synthetisierenden Algen eine Aufspaltung der Rohextrakte auf der präparativen Elektrophorese. Die mit A und B gekennzeichneten Zonen wurden getrennt fokussiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von MAYER (86) ist die Beobachtung, daß die Zonen A sowohl bei Anacystis nidulans als auch bei Plectonema boryanum einheitliche Proteine sind und nach Fokussierung nicht mehr aufspalten. Weiterhin übereinstimmend ist die Feststellung, daß die Zone A von Plectonema im pI-Wert höher liegt, als diejenige der chroococcalen Anacystis. Keine Übereinstimmung herrscht jedoch in der Höhe der isoelektrischen Punkte. Unsere gefundenen pI-Werte liegen bei 5,35 bzw. 5,12. Die von MAYER gefundenen Werte liegen deutlich darunter (4,82 bzw. 4,74). Die Ursache muß

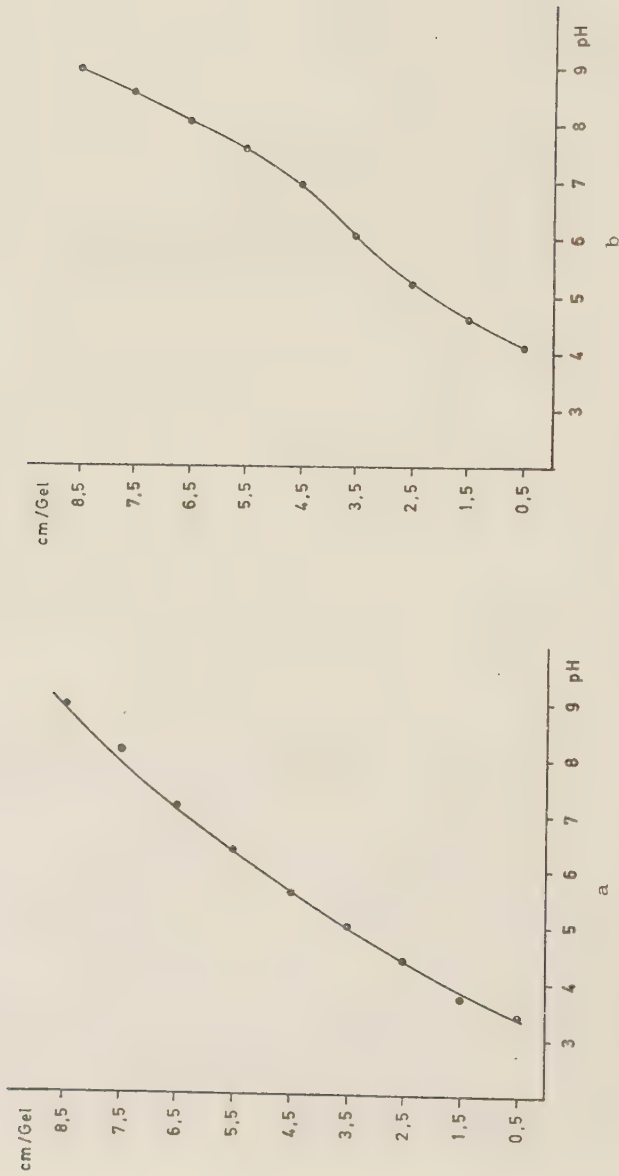


Abb. 8: Aufbau von pH-Gradienten: a) nach zweistündiger b) nach einstündiger Fokussierung (Servalyt pH 2-11). Bestimmung der pH-Werte in den Gelabschnitten nach 36 Stunden.

Tabelle 3: Isoelektrische Punkte von Phycoerythrin und Phycocyanin verschiedener Blaualgen. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um elektrophoretisch gereinigte, dialysierte und gefriergetrocknete Proben. Die isoelektrischen Punkte sind Werte aus mindestens vier Bestimmungen (Fehlergrenze $5,0 \pm 0,07$ = mittlere Abweichung). HZ = Hauptzone; NZ = Nebenzone.

Alge	pI Phycoerythrin	pI Phycocyanin
<i>Anacystis nidulans</i>		5,12 (Zone A) blau
<i>Dermocarpa violaceae</i>	5,40 HZ	
<i>Fremyella diplosiphon</i>	4,94 NZ / 5,10 NZ 5,30 HZ / 5,75 NZ	5,17 HZ / 5,37 HZ
<i>Lyngbya</i> (C39)	5,40 HZ	
<i>Nostoc muscorum</i> A	5,39 HZ	
<i>Phormidium autumnale</i> (C5) (Säule)	5,35 HZ / 6,25 NZ	5,12 HZ blau / 6,96 HZ türkis
<i>Phormidium autumnale</i> (C5) (Elektrophorese)	5,40 HZ / 6,30 NZ	
<i>Phormidium persicinum</i> (eingipflig)	5,00 HZ / 5,30 HZ	
<i>Phormidium persicinum</i> (PE II) (zweigipflig)	5,35 HZ	
<i>Plectonema boryanum</i>		5,35 (Zone A) blau
<i>Pseudanabaena catenata</i>	4,99 HZ / 5,22 HZ	
<i>Pseudanabaena</i> W 1173	4,75 NZ / 4,85 HZ	5,00 HZ / 5,27 HZ
<i>Pseudanabaena</i> W 1173 (PE II)	5,45 HZ / 5,95 HZ 6,20 HZ	
<i>Tolypothrix tenuis</i>	5,00 HZ / 5,30 HZ	5,13 HZ / 5,37 HZ

wohl im Aufbau des Gradienten gesehen werden. Diese niedrigeren Werte sind nach unseren Untersuchungen auf einen diskontinuierlichen Gradienten zurückzuführen, der zum Beispiel bei Fokussierzeiten vorkommt, die unter zwei Stunden liegen (vgl. Abb. 8).

2.3.3. Isolierung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien

Bei der Isolierung der Phycoerythrine und Phycocyanine kam es darauf an, möglichst den nativen Zustand der Proteine zu erhalten. Aus diesem Grund wurden alle Biliproteide ohne Ammoniumsulfatfällung direkt aus den frisch hergestellten Rohextrakten auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert. Hierzu eignete sich das im analytischen Maßstab benutzte Verfahren. Diese Isoliermethode zeichnete sich durch Schnelligkeit und effektive Trennung von farblosen Proteinen aus. Im Vorversuch des elektrophoretisch isolierten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins zeigte es sich, daß dieses Produkt bei einer weiteren Elektrophorese nur eine Bande erkennen ließ und nach Anfärben mit Coomassie-Blau keine weiteren Zonen auftraten. Deshalb wurde dieses Verfahren sowohl für Phycoerythrin als auch für Phycocyanin angewendet.

Die in Tabelle 4 aufgeführten niederen Extinktionskoeffizienten sind darauf zurückzuführen, daß bei der Elution der aufgetrennten Biliproteide ein Teil des Acrylamids in Lösung geht und durch die Dialyse nicht mehr vollständig entfernt werden konnte.

Das präparative Auftrennschema von nur Phycocyanin synthetisierenden Algenspecies hatte als Charakteristikum zwei Zonen, eine blaue (A) und eine türkisfarbene (B). Bei Anacystis nidulans und Plectonema boryanum läuft die türkisfarbene Zone der blauen voraus, bei Spirulina species ist dies umgekehrt. Da diese Zonen bei allen Species im Verhältnis 1 : 1 vorkamen, wurden sie getrennt eluiert und ihre Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte bestimmt.

Tabelle 4: Elektrophoretisch isolierte Phycoerythrine aus den Rohextrakten verschiedener Cyanobakterien. Die angegebenen Extinktionen entsprechen einer Konzentration von 0,1 mg/ml gefriergetrocknetem Phycoerythrin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer.

Alge	Familie	Rohextrakt Phycoerythrin max.	Phycoerythrin/rein nm E _{0,1 mg/ml} max.
Aphanocapsa (6701)	(Chroococcales)	564 nm	562 = 0,131
Fremyella diplosiphon	Microchaetaceae	565 nm	562 = 0,118
Nostoc muscorum A	Nostocaceae	565 nm	558 = 0,086
Phormidium persicinum	Oscillatoriaceae	520-550 nm (Schulter)	560 = 0,072
Pseudanabaena catenata	Oscillatoriaceae	565 nm	555 = 0,049
Pseudanabaena W 1173	Oscillatoriaceae	562 nm	558 = 0,430
Tolypothrix tenuis	Scytonemataceae	566 nm	561 = 0,366

2.3.4. Molekulargewichtsbestimmung von Pseudanabaena W 1173
C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus dem Rohextrakt

Die Molekulargewichtsbestimmung des nativen C-Phycoerythrins und C-Phycocyanins wurde mittels einer Sephadex G 200 beschickten Säule aus dem konzentrierten, ultrazentrifugierten Rohextrakt durchgeführt. Zuvor wurde die Säule mit verschiedenen Proteinen bekannter Molekulargewichte geeicht. Als Eichproteine verwendeten wir Ferritin (MG = 540 000), Aldolase (MG = 158 000), Rinderserumalbumin (MG = 67 000), Albumin aus Hühnerei (MG = 45 000), Chymotrypsinogen A (MG = 25 000) und Cytochrom C (MG = 12 500). Die durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine erhaltenen Fraktionen wurden mittels eines Fraktionsamplers aufgefangen und die Extinktionen bei 280 nm durch einen Schreiber aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die Logarithmen der Eichproteinmolekulargewichte als Funktionen der Fraktionsnummern der zugehörigen Maxima aufgetragen. Die daraus resultierende Gerade ist in Abbildung 9 dargestellt. Anschließend wurde der Rohextrakt auf dieselbe Säule aufgetragen und die Phycoerythrinfraktionen bei 560 nm, die Phycocyaninfraktionen bei 620 nm ausgemessen. Die Fraktionen mit den jeweils höchsten Extinktionen wurden auf die Eichkurve übertragen und so die Molekulargewichte ermittelt. Entsprechend den drei Maxima der Extinktionen in den Fraktionen Nr. 31, 43 und Schulter bei 47 fand man bei Phycoerythrin (Abb. 10) drei Aggregationen mit den Molekulargewichten 330 000, 76 000 und 45 000. Die Phycocyaninfraktionen zeigten zwei Maxima bei den Fraktionen 31 - 32 und 46; die entsprechenden Molekulargewichte wurden mit 250 000 und 45 000 ermittelt.

2.3.5. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien

Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten wurde mit

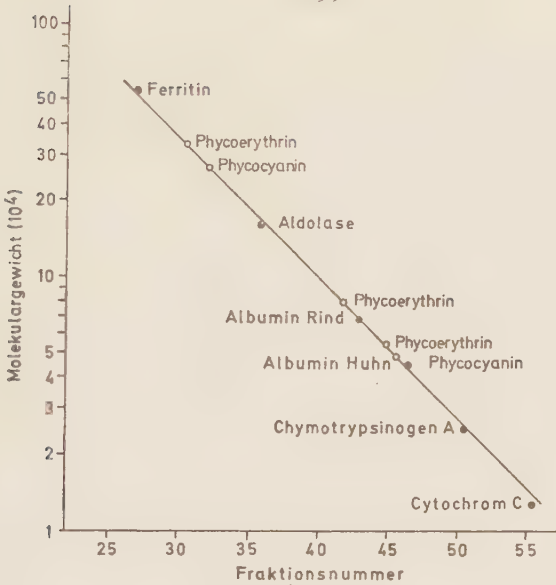


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus *Pseudanabaena* W 1173.

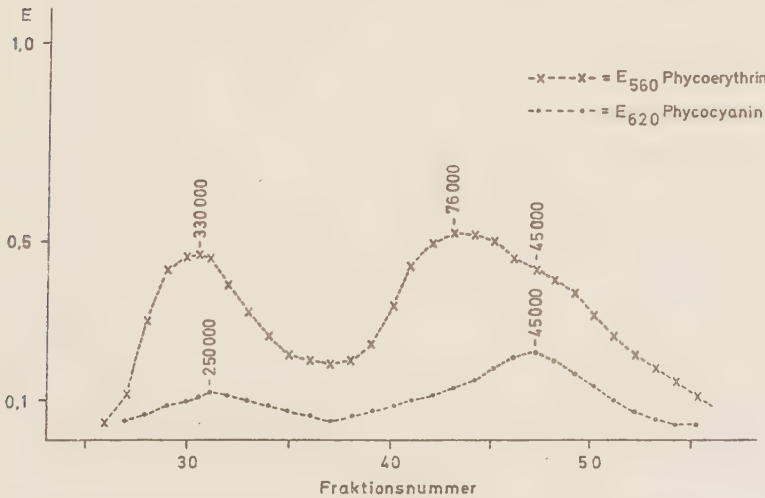


Abb. 10: Elutionsdiagramm der säulenchromatographischen Molekulargewichtsbestimmung von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus dem Rohextrakt von *Pseudanabaena* W 1173 auf Sephadex G 200.

Hilfe der SDS-Gelelektrophorese in Anlehnung an die Methode von WEBER und OSBORN (117) durchgeführt. Im Gegensatz zur Disk-Elektrophorese, bei der die elektrophoretische Mobilität der Proteine sowohl von der Ladung als auch von der Molekülgröße abhängig ist (ORNSTEIN (99) und DAVIS (24)), wandern die Proteine in Gegenwart des anionischen Tensids - Natriumdodecylsulfat - allein nach der Molekülgröße. REYNOLDS und TANFORD (106) konnten zeigen, daß eine Reihe von Polypeptiden mit SDS im Molekulargewichtsbereich von 12 400 - 200 000 hydrodynamische Komplexe bildeten und die elektrophoretische Mobilität dieser Komplexe eine Funktion der Molekulargewichte ist, wenn einerseits die Ladung dieser Protein-SDS-Komplexe konstant, und andererseits nur die hydrodynamischen Eigenschaften eine Funktion der Molekülgröße sind. Beide Kriterien wurden von den Autoren experimentell bestätigt. Somit wandern die SDS-Proteinkomplexe als Anionen und sind einheitlich von der Porengröße der verwendeten Gelkonzentrationen abhängig.

Da das Natriumdodecylsulfat außer der Ladungsvereinheitlichung auch die Proteine entfaltet, spalteten zahlreiche Eichproteine auf. Damit war ein Eichlauf auf einem einzigen Gelröhrchen ausgeschlossen und die Eichproteine mußten getrennt aufgetragen werden. Ein bis dahin noch nicht auf dem Markt befindlicher Eichsatz von Boehringer, speziell für die SDS-Gelelektrophorese, wäre für unsere Zwecke ungeeignet gewesen, da dieser Eichsatz mit den Proteinen: Trypsininhibitor (MG = 21 500), Rinderserumalbumin (MG = 68 000), R.N.A. Polymerase (MG: 55 000; 165 000; 39 000) und R.N.A. Polymerase (MG: 155 000; 165 000; 39 000) für 5% Gele verwendbar ist. Die von uns verwendeten Eichproteine waren Cytochrom C (MG = 12 500), Chymotrypsinogen A (MG = 25 000), Hühnereialbumin (MG = 45 000) und Rinderserumalbumin (MG = 67 000). Allerdings waren hier zahlreiche Vorläufe notwendig um das Aufspaltungsverhalten dieser Proteine auf der SDS-Gelelektrophorese bei den angewandten Bedingungen zu erkunden. Nach einem zwölf- bis vierzehnstündigen Elektrophoreselauf wurden nur die mit Coomassie-Blau (54) angefärbten Hauptzonen in den Lauf-

strecken vermessen. Abbildung 11 zeigt das typische Aufspaltungs-
verhalten der verwendeten Eichproteine. Diese Ergebnisse waren
sehr gut reproduzierbar.

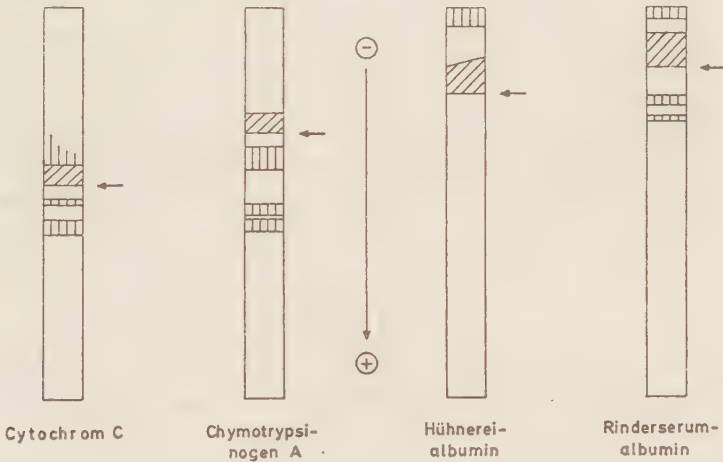


Abb. 11: Mit Coomassie-Blau angefärbte Eichproteine nach vierzehn Stunden Elektrophorese auf 12,2 % Gelen. Aufgetragen wurden je 0,25 μ g Protein. Vermessen wurden die unteren Kanten der mit $\leftarrow$ bezeichneten Zonen.

Die relative Mobilität der Proteine, bezogen auf Bromphenolblau, wurde gegen die Logarithmen der Eichproteine aufgetragen. Eine daraus resultierende Eichkurve ist in Abbildung 12 dargestellt. Übereinstimmend mit WEBER und OSBORN (117) ist die Beobachtung, daß bei Verminderung der Quervernetzerkonzentration die leichteren Polypeptide nicht auf einer Geraden liegen.

Die von uns verwendete Gelkonzentration betrug $T = 12,2 \%$, $C = 2,6 \%$. Mit dieser Gelkonzentration erhielten wir bei der Auftrennung der C-Phycoerythrine in Untereinheiten generell sehr gute Ergebnisse. Der Versuch die Untereinheiten der Biliproteide direkt aus dem Rohextrakt zu bestimmen war nicht möglich, da nur eine grobe Trennung zwischen Phycoerythrin und Phycocyanin zu

beobachten war.

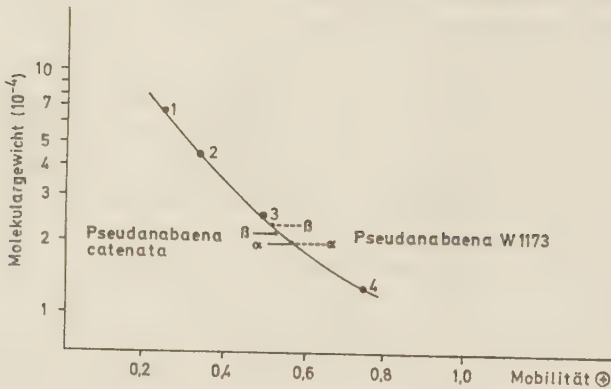


Abb. 12: Eichkurve einer vierzehnstündigen SDS-Gelelektrophorese auf 12,2 % Acrylamidgelen. 1 = Rinderserumalbumin, 2 = Hühnereialbumin, 3 = Chymotrypsinogen A, 4 = Cytochrom C.

Die Molekulargewichte der Untereinheiten erhielt man durch Übertragen der Mobilitäten auf die Eichkurve und Ablesen auf der Ordinate.

Bei allen untersuchten C-Phycocerythrinen reichte eine kurze Inkubation mit SDS aus um die Aufspaltung in Untereinheiten zu bewirken. Bei den C-Phycocyaninen jedoch war es notwendig die Proben vorher zwei Stunden bei 37° C mit 0,1 % β -Mercaptoäthanol und 8 M Harnstoff zu inkubieren. Das Versetzen aller C-Phycocerythrine mit SDS bewirkte eine spontane Fluoreszenzabnahme. Eine Mercaptoäthanol-Inkubation der Phycocyanine ließ ein fast totales Ausbleichen dieser Pigmente erkennen, wobei ein grüngelber Farbton auftrat. Dieser erwies sich als unbedingtes Kriterium für eine Aufspaltung der Phycocyanine in Untereinheiten.

Zunächst wurde versucht die Molekulargewichte der Untereinheiten von nicht proteolytisch abgebautem und dem Proteolyseprodukt (vgl. S. 37) des Pseudanabaena Phycocerythrins zu bestimm-

men. Beim intakten Phycoerythrin erhielten wir eine eindeutige Aufspaltung in die Untereinheiten, mit definierten Molekulargewichten: α -Kette = 19 400 , β -Kette = 22 800. Beim Proteolyseprodukt ließ sich nun eindeutig beweisen, daß hier sowohl die α -Kette als auch die β -Kette abgebaut vorlag: Dieses Phycoerythrin ließ keine Aufspaltung mehr in Untereinheiten erkennen. Vielmehr war eine diffuse Zone, die nach der Elektrophorese einen geringen Abstand zum Bromphenolblau hatte, zu erkennen. Eine exakte Molekulargewichtsangabe ließ sich hier nicht machen. So gab der Durchschnittswert aus fünf Bestimmungen einen Molekulargewichtsbereich von 10 000 - 13 000 (Abb. 13).

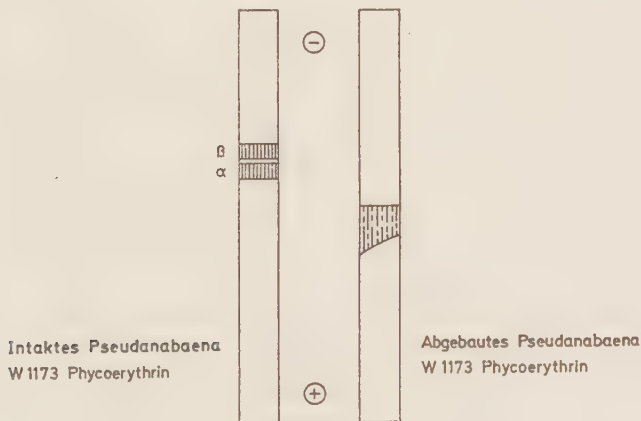


Abb. 13: Mit Coomassie-Blau angefärbte SDS-Gele der Molekulargewichtsbestimmung von intaktem und abgebautem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin. Aufgetragen wurden je 0,1 ml Lösung der Extinktion 0,2 bei 560 nm.

Bei den übrigen in Tabelle 5 aufgeführten Untereinheitsbestimmungen trat eine solche Erscheinung nicht mehr auf, sodaß diese Molekulargewichte direkt miteinander vergleichbar waren.

Tabelle 5: Molekulargewichtsvergleich der Untereinheiten von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyanobakterien.

Alge	C-Phycoerythrin α-Kette	C-Phycoerythrin β-Kette	C-Phycocyanin α-Kette	C-Phycocyanin β-Kette	Literatur
Aphanocapsa 6701	20 000	22 000	16 600	20 000	GLAZER/COHEN-BAZIRE 1971
Fremyella diplosiphon	18 300	20 000	16 300	17 600	BENNETT/BOGORAD 1971
Tolypothrix tenuis	18 300	20 000	16 300	17 600	BENNETT/BOGORAD 1971
Phormidium persicinum	19 700	22 000			O'CARRA/KILLILEA 1971
Dermocarpa violaceae	22 300 ± 1 000	24 600 ± 1 000			diese Arbeit
Phormidium autumnale C5	16 000 ± 1 000	19 000 ± 1 000			diese Arbeit
Pseudanabaena catenata	19 500 ± 1 000	22 000 ± 1 000			diese Arbeit
Pseudanabaena W 1173	19 400 ± 500	22 000 ± 600	19 000 ± 1 000	22 000 ± 1 000	diese Arbeit

Tabelle 6: Vergleich der Molekulargewichte von C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus Pseudanabaena W 1173 mit Literaturwerten.

Alge	Molekulargewicht P.E.	Molekulargewicht P.C.	pH	Methode	Literatur
Tolypothrix tenuis	226 000	138 000	7,2	Sedimentations-, Diffusionskonstanten	HATTORI/FUJITA
Fremyella diplosiphon	180 000- 210 000		7,0	Säule Sephadex G 200	BENNETT/BOGORAD
Pseudanabaena W 1173	332 000 76 000 45 000	250 000 45 000		Säule Sephadex G 200	diese Arbeit

Vergleichbare Werte von Molekulargewichtsbestimmungen C-Phycocerythrin und C-Phycocyanin synthetisierender Cyanobakterien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Obwohl die angewandten Methoden von HATTORI, FUJITA und BENNETT/BOGORAD verschieden sind, ergeben sich für die bestimmten Phycocerythrinaggregationen aus Tolypothrix tenuis und Fremyella diplosiphon durchaus vergleichbare Werte. Einheitlich wurden beide Ergebnisse nach vorangegangener Ammoniumsulfatfällung der Phycocerythrine erhalten. Der von uns gefundene Wert für die höchste Phycocerythrinaggregation bei pH 7,0 ist ungewöhnlich hoch. Legt man bei der Betrachtung der möglichen Aggregationsverhältnisse die kleinste Einheit des Pseudanabaena W 1173 Phycocerythrins mit $MG = 45\ 000$ zugrunde, so bewegt sich der gefundene Wert von $330\ 000$ zwischen einem hexameren und einem oktomeren Produkt, näher jedoch bei dem Oktomer. Die zweite Aggregation von $76\ 000$ muß demnach als Dimer angesehen werden. Die gleichfalls kleinste Einheit von $45\ 000$ für das Phycocyanin ist in direkter Übereinstimmung mit den Angaben von HATTORI et al. (59). Bei einer Fehlerkalkulation von $\pm 5\%$ ergibt sich, daß es sich bei dem von uns gefundenen höheren Aggregat von $250\ 000$ um ein Hexameres handelt (nach HATTORI et al. $268\ 000$).

Eine indirekte Übereinstimmung, daß die Molekulargewichte für Pseudanabaena W 1173 C-Phycocerythrin und C-Phycocyanin sehr ähnlich sind, liefert die Summe der nach SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Untereinheiten. Aus Tabelle 5 ergibt sich somit für C-Phycocerythrin ein Molekulargewicht von $42\ 000$ und für C-Phycocyanin $41\ 000$. Eine durchaus zulässige Fehlerquote von $\pm 1\ 000$ unterstreicht auch hier die sehr große Ähnlichkeit. Bei der säulenchromatographischen Molekulargewichtsbestimmung des elektrophoretisch isolierten Phycocerythrins aus Pseudanabaena W 1173 fand MUCKLE (89) eine einzige rote Zone mit einem Molekulargewicht von $45\ 000$. Verglichen mit den dazugehörenden Untereinheiten (Tabelle 5) kann man annehmen, daß es sich um ein Monomer handelt. Keine großen Unterschiede bestehen auch im Vergleich der Untereinheiten des C-Phycocerythrins von Pseudana-

baena W 1173 mit Pseudanabaena catenata. Daß die von uns gefundenen Ähnlichkeiten nicht etwa auf Zufall zurückzuführen sind, zeigen die Ergebnisse der Untereinheiten aus zwei weiteren Algenspecies. So finden wir einerseits bei der Pleurocapsalen Dermocarpa violaceae relativ hohe Untereinheitswerte für das C-Phycoerythrin. Andererseits sind die Werte von Phormidium autumnale besonders niedrig. Betrachtet man hinsichtlich des Phycoerythrins alle Werte der in Tabelle 5 angegebenen Untereinheiten, so läßt sich Folgendes sagen: Mit Ausnahme der Phormidium autumnale sind die Untereinheiten der Nostocalen, bestehend aus Pseudanabaena W 1173, Pseudanabaena catenata, Fremyella diplosiphon und Tolypothrix tenuis sehr ähnlich. Deutlich unterscheiden sich die Untereinheiten der Chroococcalen Aphanocapsa 6701 und der Pleurocapsalen Dermocarpa violaceae.

2.3.6. Untersuchung der Chromophorenanzahl bei den Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten

Gelelektrophoretische Isolierung der Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten

Bei der Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten fiel auf, daß bei dem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin die β -Kette intensiver rot gefärbt war, als die leichtere α -Kette. Diese Beobachtung konnte nur mit unterschiedlichen Chromophoranteilen in Zusammenhang gebracht werden. Die Untersuchung der Anzahl der Phycoerythrinchromophore auf den beiden Ketten war jedoch nur dann sinnvoll, wenn die Proteinanteile gleich waren. Deshalb überprüfte man zunächst die Proteinverhältnisse nach präparativer SDS-Gelelektrophorese.

Zur präparativen Isolierung der Untereinheiten wählten wir dieselben Bedingungen wie bei der Molekulargewichtsbestimmung. Nur wurde hier das frisch hergestellte, isolierte Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin nicht gefriergetrocknet, sondern das Eluat direkt zur Auftrennung verwendet. Gesammelt wurden die Eluate

von fünf Elektrophoresen (je acht Röhrchen).

Proteinbestimmung der gelelektrophoretisch isolierten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten

Die Proteinbestimmung der Untereinheiten erfolgte nach einer Methode von LOWRY et al. (78) mit Folin-Ciocalteu Reagenz. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin in der Konzentration 25 μg - 150 μg verwendet. Die zu messende Farbentwicklung der Proben wurde nach einer Stunde im Zeiss (DMR 22) bei 750 nm gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte lagen, wie aus Abbildung 14 ersichtlich, befriedigend auf einer Geraden. Bei gleichem Volumen der Untereinheiteneluate (0,25 ml) erhielten wir ein Proteinverhältnis von $\alpha : \beta = 96 \mu\text{g} : 125 \mu\text{g}$, was einem Verhältnis von 1 : 1,3 entspricht. Berücksichtigt man nun die Molekulargewichtsdifferenz der beiden Ketten, so ergibt sich ein Verhältnis von 1 : 1,1.

Densitometrie der aufgetrennten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten vor und nach Anfärben mit Coomassie-Blau

Das gefundene Proteinverhältnis veranlaßte uns zu einer direkten densitometrischen Auswertung nach erfolgter SDS-Elektrophorese. Das Densitogramm in Abbildung 15 zeigte deutlich, daß die β -Kette einen höheren Peak aufwies. Die direkte Integration der beiden Flächen ergab ein Verhältnis von $\alpha : \beta = 1 : 1,45$. Multipliziert man dieses Verhältnis mit zwei, so ergibt sich eine mögliche Chromophorenverteilung von 2 : 3. Desgleichen wurden die mit Coomassie-Blau angefärbten Untereinheiten densitometrisch ausgewertet. Die hierbei durch Integration erhaltenen Werte von 1 : 0,98 entsprachen ebenfalls einem Verhältnis von 1 : 1, was mit der Proteinbestimmung nach Elution übereinstimmte. Die Beobachtung (Abb. 15), daß sich die leichtere α -Kette hier etwas stärker anfärbt, ist wohl auf die

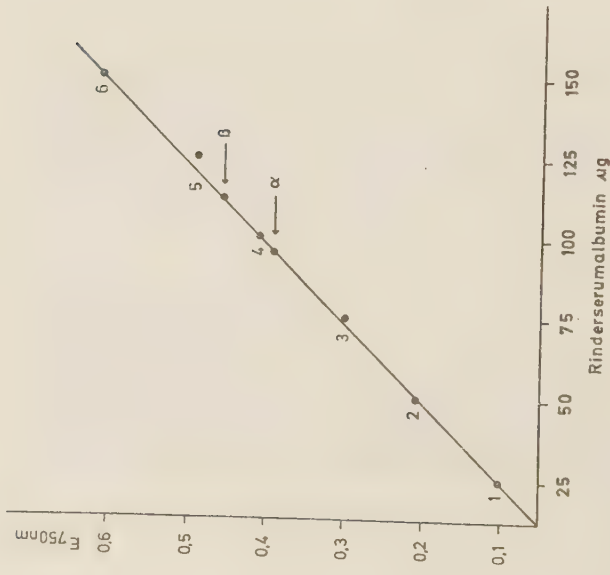


Abb. 14: Eichgerade zur Proteinbestimmung der Pseudanabaena W 1173 Untereinheiten. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 sind die Meßwerte bei 750nm für 25 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 125 µg und 150 µg Rinderserumalbumin. Die mit $\leftarrow$ bezeichneten Punkte sind die Meßwerte der beiden Untereinheiten, bezogen auf je 0,25 ml Eluat.

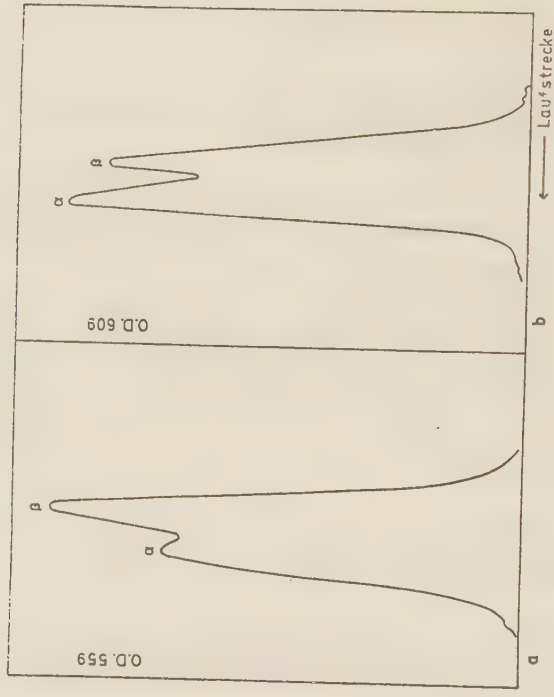


Abb. 15: Densitogramme der Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten nach zwölfstündiger SDS-Gelelektrophorese a) direkt nach dem Lauf b) nach Anfärben mit Coomassie-Blau.

unterschiedliche Wechselwirkung des Coomassie-Anions mit dem Protein der beiden Untereinheiten zurückzuführen. Insbesondere sind hierfür die basischen Aminosäuren verantwortlich. So beträgt das Lysinverhältnis von der α -Kette : β -Kette = 9 : 5 (89).

2.3.7. Untersuchung von gelelektrophoretisch erhaltenen Phycocyanin-Eluaten

Die elektrophoretische Auftrennung der Rohextrakte von nur Phycocyanin synthetisierenden Blaualgen ergab auf dem Tris-Glycinsystem pH 8,8 eine Aufspaltung in zwei verschieden gefärbte Zonen. Diese Beobachtung machten wir bei Anacystis nidulans, Plectonema boryanum und einer Spirulina species. Bei Anacystis nidulans und Plectonema boryanum lief eine türkisfarbene Zone vor einer dunkelblauen. Bei Spirulina species war die Reihenfolge umgekehrt. Diese Zonen wurden gelelektrophoretisch getrennt und mit destilliertem Wasser eluiert. In allen drei Fällen waren die Maxima der eluierten Zonen gegenüber den Rohextrakten deutlich in den kürzerwelligen Bereich verschoben (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der Rohextraktmaxima mit den eluierten Zonen.

Alge	Rohextrakt* $\lambda_{\max}$ nm	Blaue Zone $\lambda_{\max}$ nm	Türkisfarbene Zone $\lambda_{\max}$ nm
Anacystis nidulans	623	612	614 , (680)
Plectonema boryanum	628	610	615 , (670)
Spirulina species	620	617 (650), (700)	605 , 615 (670), (700)

*) Die Rohextrakte sind in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen.

Auch absorbierte bei Anacystis (Abb. 16) und Plectonema (Abb. 17) die blaue Zone kürzerwellig gegenüber dem türkisfarbenen Eluat.

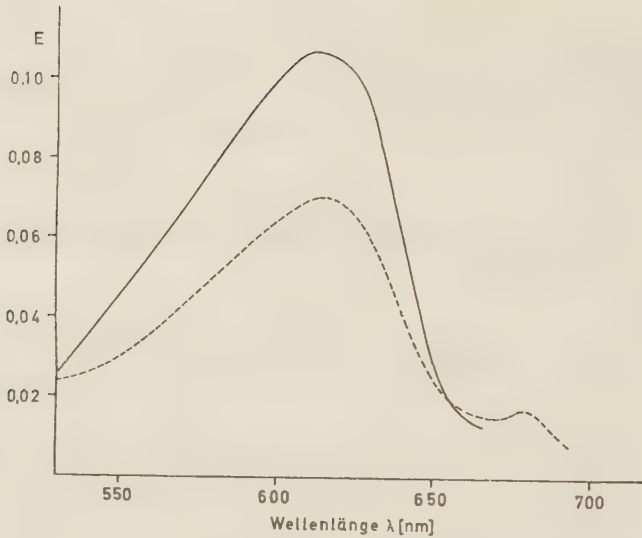


Abb. 16: Absorptionsspektrum der elektrophoretisch gereinigten Phycocyanineluate von *Anacystis nidulans*. — Blaue Zone; -- Türkisfarbene Zone. Verdünnung 1 : 8 mit Aqua bidest., gemessen gegen Aqua bidest.

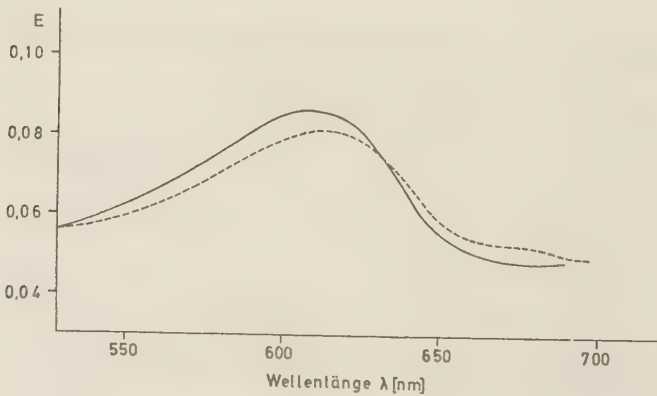


Abb. 17: Absorptionsspektrum der elektrophoretisch gereinigten Phycocyanineluate von *Plectonema boryanum*. — Blaue Zone; -- Türkisfarbene Zone. Verdünnung 1 : 8 mit Aqua bidest., gemessen gegen Aqua bidest.

Eine Ausnahme machte Spirulina. Hier absorbierte die blaue Zone geringfügig längerwellig, außerdem ließ das Spektrum der türkisfarbenen Zone ein Doppelmaximum erkennen (Abb. 18). Daneben in den türkisfarbenen Zonen ein weiteres langwelliges Maximum, schwach ausgeprägt.

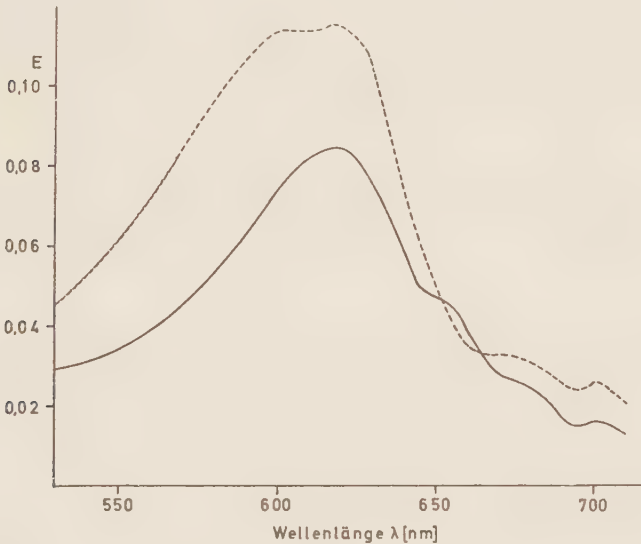


Abb. 18: Absorptionsspektrum der elektrophoretisch gereinigten Phycocyanineluate von *Spirulina* species. — Blaue Zone; -- Türkisfarbene Zone. Verdünnung 1 : 8 mit Aqua bidest., gemessen gegen Aqua bidest.

Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, zeigen die Maxima der eluierten Zonen deutliche Abweichungen von den entsprechenden Rohextrakten. Die Unterschiede zwischen den beiden eluierten Banden bei allen Species sind so gering, daß sie wohl nicht als charakteristisch angesehen werden dürfen. Vielmehr ist hier eine Veränderung der Proteine während der Elution zu vermuten. Dies ist in Abb. 17 bei den *Plectonema* eluaten offensichtlich. Derartig flach verlaufende Absorptionsspektren sind typisch für bereits stark denaturierte Proteine. Solche Spektren erhält man

zum Beispiel, wenn man Rohextrakte leicht erwärmt und dann wieder abkühlt. Bei der Erwärmung werden die Proteinketten entfaltet und beim Abkühlen tritt aber keine vollkommene Zurückfaltung mehr ein. Begleitet ist diese Erscheinung von einem Ausbleichen der blauen Farbe. Bei allen diesen Algenspecies dürfte die türkisfarbene Zone kein Allophycocyanin sein. Eine Andeutung für Allophycocyanin im Bereich von 650 nm findet man nur bei dem Eluat der blauen Zone von Spirulina species (Abb. 18). Das bei 680 nm beobachtete Maximum bei allen türkisfarbenen Zonen könnte auf einen Zinkkomplex zurückzuführen sein.

2.3.8. Molekulargewichtsbestimmungen der Phycocyanineluate vor und nach Inkubation mit 8 M Harnstoff und β -Mercaptoäthanol

Bei dieser Untersuchung sollte gezeigt werden, inwieweit sich die auf der Trisglycinelektrophorese (pH 8,8) erhaltenen Zonen im Molekulargewicht unterscheiden und ob die Behandlung mit β -Mercaptoäthanol eine nochmalige Spaltung der Proteine bewirkt.

Die nach der präparativen Elektrophorese mit Aqua bidest. eluierten Phycocyanine wurden direkt zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet. Grundsätzlich bestätigte sich die bei Pseudanabaena W 1173 gemachte Beobachtung. Bei den nur mit SDS inkubierten Proben trat in allen Fällen keine Spaltung der einzelnen Proteine nach vierzehnstündiger Elektrophorese auf. Da diese Untersuchungen mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese durchgeführt wurden, konnte man die Molekulargewichte der eluierten Protein-zonen feststellen. Die Durchschnittswerte der nur mit SDS inkubierten Proben aus mindestens drei Bestimmungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Aus dieser Tabelle ergibt sich für die blauen Zonen in der Gesamtbetrachtung ein durchschnittlich niedrigeres Molekulargewicht als für die türkisfarbenen Banden. Nach Inkubation der Protein-zonen mit dem reduzierenden Detergens β -Mercaptoäthanol trat bei Plectonema boryanum und Spirulina species eine Spal-

tung nur bei den blauen Zonen auf. Die Aufspaltung der türkisarbenen Zone bei Anacystis ist möglicherweise auf eine Verunreinigung dieser Bande mit der blauen zurückzuführen (Tabelle 9).

Tabelle 8: Molekulargewichte der blauen und türkisarbenen Zone nach Inkubation mit SDS.

Alge	Blaue Zone (MG · 10 ³)	Türkisarbene Zone (MG · 10 ³)
Anacystis nidulans	22,5	22,5
Plectonema boryanum	20,9	23,5
Spirulina species	20,2	21,3

Tabelle 9: Molekulargewichte der blauen und türkisarbenen Zone nach Inkubation mit β-Mercaptoäthanol und 8 M Harnstoff.

Alge	Blaue Zone (MG · 10 ³)	Türkisarbene Zone (MG · 10 ³)
Anacystis nidulans	23,6	25,2
	22,1	22,7
Plectonema boryanum	16,8	22,0
	13,8	
Spirulina species	21,0	21,5
	22,2	

Bei der Betrachtung der Molekulargewichte (Tabelle 8) ist bei Plectonema und Spirulina für die türkisarbene Zone, gegenüber der blauen, ein geringfügig höheres Molekulargewicht festzustellen. Somit ist das Verhalten auf der präparativen Elektrophorese für Plectonema und Anacystis, bei denen die türkisarbene Zone vorausläuft, auf einen Ladungseffekt zurückzuführen. Tatsächlich ergibt die Bestimmung der isoelektrischen Punkte dieser Zonen in beiden Fällen eine Aufspaltung und niedrigere

pI-Werte als die nicht aufspaltenden blauen Zonen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Isoelektrische Punkte der blauen und türkisfarbenen Zonen nach Elution.

Alge	Blaue Zone (pI-Wert)	Türkisfarbene Zone (pI-Wert)
Anacystis nidulans	5,75	5,40 5,60
Plectonema boryanum	5,80	5,40 5,60
Spirulina species	5,00 5,47	5,47

Eine Ausnahme machte hier nur Spirulina species, wo das Aufspalten der blauen Zone aufgrund der pI-Werte den Schluß einer ungenügenden Trennung bei der präparativen Elektrophorese zuläßt. Die Inkubation der Eluate mit β -Mercaptoöthanol und Harnstoff ergab mit Ausnahme von Anacystis nur eine Aufspaltung der blauen Zonen. Neben der proteinentfaltenden Wirkung des Harnstoffs reduziert das β -Mercaptoöthanol Disulfidbrücken, die offensichtlich in allen blauen Zonen vorkommen. Die Aufspaltung der türkisfarbenen Zone bei Anacystis ist möglicherweise auf eine Verunreinigung dieser Bande mit der blauen zurückzuführen.

Eine Aufspaltung von Disulfidbrücken in einem Protein läßt das Auftreten von zwei Teilstücken erwarten, deren Molekulargewichte zusammengezählt das Molekulargewicht des ungespaltenen Moleküls ergeben müßte; in vorliegendem Fall in der Größenordnung von 20 000 - 22 000. Die aufgetretenen Teilprodukte liegen jedoch für sich in der Größenordnung des gesamten Proteins (Tabelle 9). Diese Ergebnisse lassen zwei Interpretationen zu. Die Reduktion mit β -Mercaptoöthanol bewirkt nur das Abtrennen eines kleinen Bruchstückes der Kette, das zuvor über eine S-S-Brücke mit diesem verbunden war. Die resultierenden Restketten müssen in jedem Fall kleinere Molekulargewichte als die Ausgangskette besitzen. Dies ist allerdings nur im Falle von Plectonema so.

Wie REYNOLDS und TANFORD (106) zeigten, umhüllt das SDS das gesamte Proteinmolekül und bildet einen stäbchenförmigen Komplex, dessen Länge nur mit dem Molekulargewicht variiert. Eventuelles Auftreten von Schlingen, sogenannten Loops, tritt nach außen hin nicht in Erscheinung. Das scheinbare Molekulargewicht entspricht in erster Näherung einer gestreckten Proteinkette. Dies würde sich jedoch nach Reduktion der S-S-Brücken ändern, was eine Verlängerung des Proteinmoleküls zur Folge hätte. Somit wäre dies eine Erklärung für die scheinbare Erhöhung des Molekulargewichtes, was in drei Fällen vorkam. Würde nur eine Proteinkette eine solche Schleife enthalten, oder wären die Schleifen von unterschiedlicher Länge, so wäre dies die Erklärung für das Auftreten zweier verschiedener Banden. Wären sich die Ketten in einer dieser Voraussetzungen gleich, so ergäbe sich infolgedessen eine einheitliche Bande entsprechend gleicher Molekulargewichte.

3. Proteolyse

Dieses Kapitel beschreibt eine bisweilen auftretende Phycoerythrinform, die durch proteolytische Einflüsse hervorgerufen ist und bei chemisch-physikalischen Untersuchungen gesondert betrachtet werden muß.

Bei der Isolierung von C-Phycoerythrin, sowohl auf der Säule als auch auf der Gelelektrophorese war auffallend, daß sich bei gewissen Algenspecies zum Teil rote Zonen finden ließen, die sich nach Isolierung spektral von der Hauptzone bzw. vom frischen Rohextrakt unterschieden. Sowohl in einem frischen, als auch in einem älteren Rohextrakt ließ sich dieser Phycoerythrintyp nachweisen, der neben dem kennzeichnenden Maximum bei 560 nm ein zusätzliches, ausgeprägtes Maximum bei 540 nm erkennen ließ. Dieses Phänomen beschrieb NULTSCH (91) bei einer Phormidium autumnale, O'hEOCHA/HAXO (98) bei Phormidium fragile und HAXO et al. (61) bei anderen Phormidiumspecies. Während NULTSCH noch davon ausging, daß möglicherweise zwei Typen von Phycoerythrin in Cyanobakterien vorkommen, gilt es für O'hEOCHA als sicher, daß

dieses zweigipflige Phycoerythrin ein Proteolyseprodukt ist, das sich nach Aufbrechen der Zellen bildet. Auffallend ist, daß diese veränderten Phycoerythrine insbesondere bei Phormidium-Arten auftreten.

So fanden auch wir, daß das Phycoerythrin aus Phormidium persicinum wesentlich empfindlicher ist als zum Beispiel das Phycoerythrin aus unserer Pseudanabaena W 1173. Bei allen anderen von uns untersuchten Algen war dieses Proteolyseprodukt nicht zu beobachten. Tatsache ist, daß bei einer verzögerten Aufarbeitung nach dem Aufbrechen der Zellen und längerem Stehen bei Zimmertemperatur die Bildung eines solchen Phycoerythrins (PE II) begünstigt wird.

Der Nachweis für proteolytisch degradierte Phycoerythrine wurde bereits bei den verschiedenen analytischen Methoden beschrieben, wird aber hier nochmals zusammengefaßt:

1. Verhalten auf der Tris-Glycin Gelelektrophorese in Zusammenhang mit der isoelektrischen Fokussierung. Wie aus Abbildung 6 auf Seite 21 ersichtlich, hat das PE II aus Phormidium persicinum eine sehr hohe Mobilität (0,62). Der pI-Wert dieses Phycoerythrins unterscheidet sich jedoch im Vergleich mit dem intakten Protein nur geringfügig. Berücksichtigt man nun die Differenz der pI-Werte zum Trenngelpuffer, so wäre zu erwarten, daß das PE II aus Phormidium persicinum eine geringere Mobilität aufweist, da es näher beim pH-Wert des Trenngelpuffers liegt (pH 8,8). Das beobachtete Gegenteil läßt den Schluß zu, da die analytische Gelelektrophorese außer der Ladung einen gewissen Siebeffekt aufweist, daß sich das Proteinmolekül verkleinert hat. Die pI-Werte des PE II aus Pseudanabaena W 1173 sind gegenüber dem intakten Protein deutlich erhöht, was offensichtlich das Auftreten von mehreren basischen Bruchstücken bedeutet.
2. Bei der Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von PE II aus Pseudanabaena W 1173 auf der SDS-Gelelektrophorese beobachtet man keine Trennung der beiden Proteinketten mehr. Hier läßt sich nur noch ein Molekulargewichtsbereich von 10 000 - 13 000 angeben (vgl. S. 37), was auf eine Verkleiner-

ung beider Ketten der Untereinheiten schließen läßt.

3. Eine weitere Charakterisierung für die proteolytisch degradierten Phycoerythrine sowohl bei Pseudanabaena W 1173 als auch bei Phormidium persicinum PE II, ist die Diffusion von zwei Präzipitationsbanden im Ouchterlonytest, wobei die äußere im Vergleich mit dem homologen, intakten Phycoerythrin einen überdurchschnittlich großen Sporn bildet.



Abb. 19: Immunologischer Vergleich im Diffusionstest zwischen PE I und PE II aus Pseudanabaena W 1173.

Diese Spornbildung dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, daß offensichtlich nur noch ein Teil determinanter Gruppen bei PE II vorhanden sind.

BERNS (7) gibt mehrfache Präzipitationsbanden für "natives" Phycoerythrin aus Phormidium persicinum an, jedoch zeigen die von ihm angegebenen Absorptionsmaxima (540 nm und 570 nm), daß er in Wirklichkeit mit partiell proteolysiertem Phycoerythrin gearbeitet hat. O'hEOCHA (96) konnte zeigen, daß bei der Einwirkung von Trypsin auf Phycoerythrin ein Typ entstand, der im Absorptionsspektrum dem autolytischen Produkt entsprach. Die SDS-Gelelektrophorese eines partiell trypsinabgebauten Phycoerythrins aus Pseudanabaena W 1173 (vgl. S. 52) zeigte noch eine klare Aufspaltung in Untereinheiten (Abb. 20), wobei im Vergleich mit dem intakten Phycoerythrin die β -Kette gleich schwer blieb, die α -Kette dagegen deutlich abnahm, was in einer Mobilitätszunahme erkennbar war. Für die β -Kette fand man ein Molekulargewicht von 23 000, für die α -Kette von 16 000 (Abb. 21). Inwieweit abgebautes Phycoerythrin bei Phormidium persicinum vorliegt, kann man bereits dem Rohextrakt entnehmen (Abb. 22).

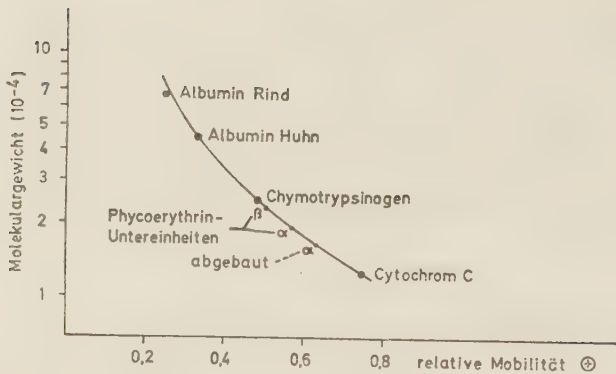


Abb. 20: Auftrennschema der Molekulargewichtsbestimmung von mit Trypsin partiell abgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-Untereinheiten auf 12 % Acrylamidgelen.

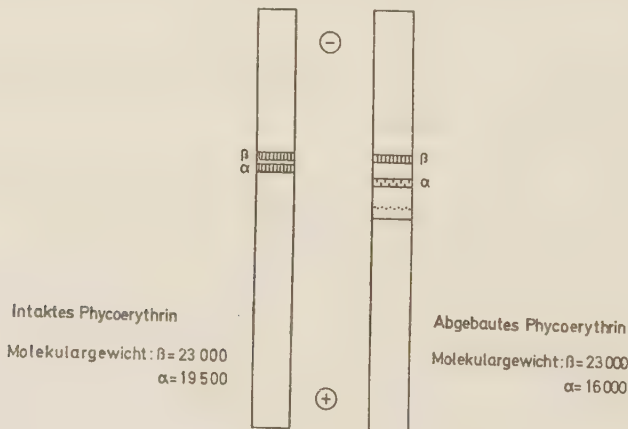


Abb. 21: Eichkurve zur Bestimmung des Molekulargewichtes von intaktem und partiell trypsinabgebautem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin.

Typisch hierfür ist neben dem eigentlichen Maximum bei 560 nm eine breite Schulter von 520 - 540 nm. Dieses Spektrum ist identisch mit dem von NULTSCH aufgeführten Rohextraktspektrum

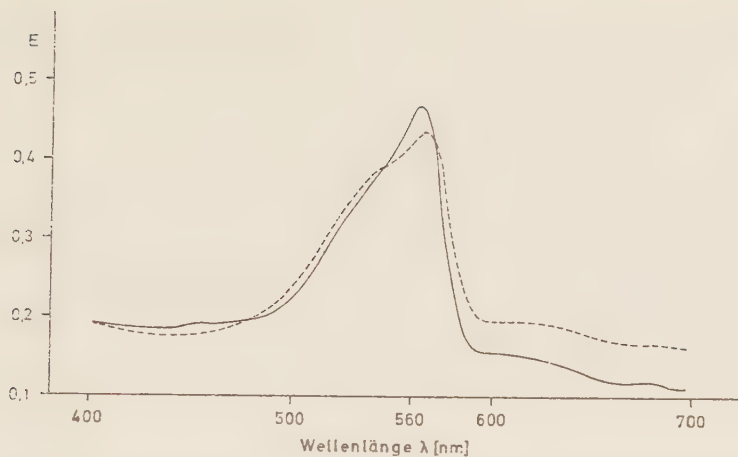


Abb. 22: Absorptionsspektrum eines sehr viel PE II enthalten-
den Rohextraktes (1 : 10 verdünnt) von *Phormidium persicinum*.
Aufgenommen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0.— Isolier-
tes Phycoerythrin;-- Rohextrakt.

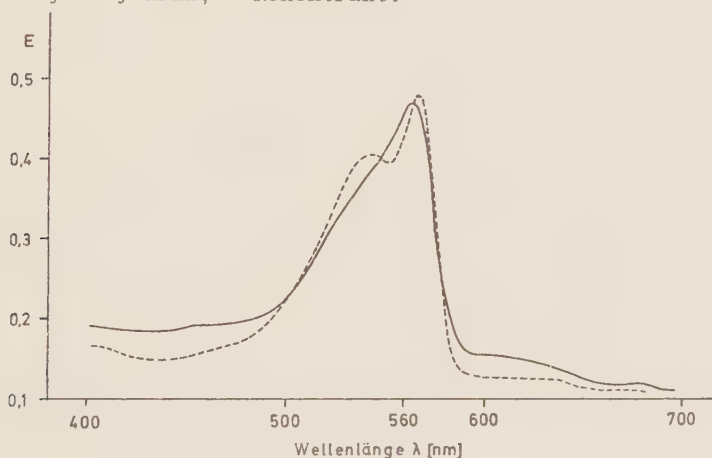


Abb. 23: Absorptionsspektren der Phycoerythrinzonen von *Phor-*
midium persicinum nach gelelectrophoretischer Auftrennung.
Aufgenommen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0.— Obere
Zone (M_B 0,46);-- vorauslaufende Zone (M_B 0,62), vgl. S. 22.

aus Phormidium autumnale. Ein solcher Rohextrakt ergibt sowohl auf der Säule als auch auf der Elektrophorese (vgl. S. 22) vor- auslaufende zweigipflige Phycoerythrinzonen, die quantitativ abgetrennt werden können (Abb. 23).

Im Falle von Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin ist eventuelles PE II nicht direkt aus dem Rohextrakt ersichtlich. Einen Nachweis hierfür ergibt erst die elektrophoretische Auftrennung, bei der rote Zonen vor dem Phycocyanin wandern, vgl. S. 22. Erste Charakterisierungsschritte des PE II aus Pseudanabaena W 1173 sind mit überdurchschnittlich hohen pI-Werten und nicht mehr zu definierenden Molekulargewichten der Untereinheiten auf den Seiten 28 bzw. 37 beschrieben.

4. Untersuchung eines besonderen Phycoerythrins aus Phormidium autumnale (C5)

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, handelt es sich bei den zweigipfligen Phycoerythrinen um Proteolyseprodukte, die so in den Algenzellen nicht vorliegen dürften. Eine Besonderheit fanden wir jedoch bei Phormidium autumnale (C5).

Wie aus dem Rohextraktspektrum in Abbildung 24 ersichtlich, zeichnet sich diese Alge durch ein Doppelmaximum (552 nm und 570 nm) im Phycoerythrinbereich aus. Ein echtes Doppelmaximum eines Phycoerythrins bei Cyanobakterien dürfte wohl nur bei Oscillatoria princeps var. minor von HIROSE et al. (63) gefunden worden sein. Zunächst mußte geklärt werden inwieweit dieses nicht durch proteolytische Einflüsse hervorgerufen war, oder sogar durch ein bisher nur bei Rotalgen beschriebenes R-Phycocyanin (Maxima 555 nm und 615 nm). Die proteolytisch degradierten Phycoerythrine zeichnen sich jedoch durch ein ausgeprägtes Maximum bei 540 nm aus, wobei sich im Anfangsstadium der Degradation das ursprüngliche Maximum bei 560 nm in den kürzerwelligen Bereich verschiebt.

Das Ergebnis der disk-gelelektrophoretischen Auftrennung dieses Rohextraktes ist in Abbildung 6, Seite 21 dargestellt. Hierbei

liefen der abgetrennten Phycoerythrinbande zwei violette Mischzonen voraus.

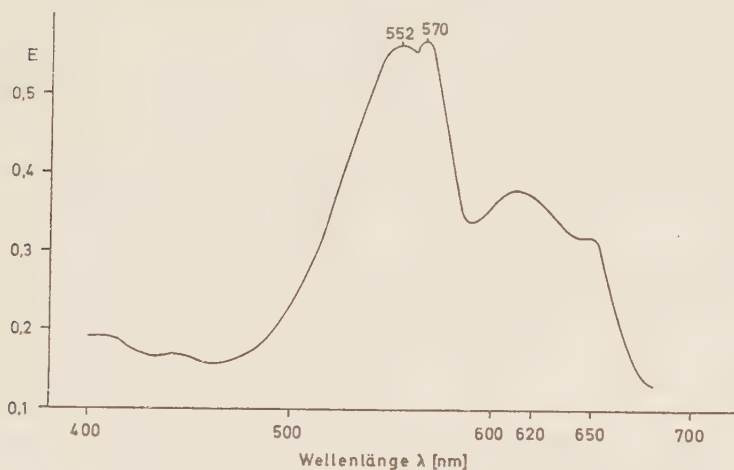


Abb. 24: Absorptionsspektrum des 1 : 10 verdünnten Rohextraktes aus *Phormidium autumnale* (C5), aufgenommen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0.

Das in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommene Absorptionsspektrum des eluierten Phycoerythrins ließ im Vergleich mit dem Rohextrakt eine Verschiebung der beiden Maxima in den kürzerwelligen Bereich erkennen, wobei das Maximum bei 546 nm leicht erhöht war (Abb. 25). Daraus folgte, daß das Doppelmaximum nur in Zusammenhang mit dem Phycoerythrin zu sehen war. Eventuell vermutetes R-Phycocyanin war somit auszuschließen. Bei der Betrachtung des Absorptionsspektrums des Eluates war festzustellen, daß das charakteristische Doppelmaximum zwar noch vorhanden war, daß aber trotzdem eine Veränderung des Phycoerythrins stattgefunden haben mußte. Eine Reelektrophorese des eluierten Produktes bestätigte den Teilabbau. Das Phycoerythrin spaltete im Verhältnis 1 : 1 auf, wobei die Mobilitätswerte im Vergleich mit dem im Rohextrakt aufgetrennten Phycoerythrin deutlich erhöht war. Durch direkte Messung der entstandenen Phycoerythrin-

zonen im Gel konnte gezeigt werden, daß ein Abbau in zwei Stufen erfolgte. Bereits die obere Zone wies nur noch undeutliche Maxima bei ≈ 544 nm und ≈ 546 nm auf, während die untere nur ein breites Maximum von 520 nm - 570 nm zeigte.

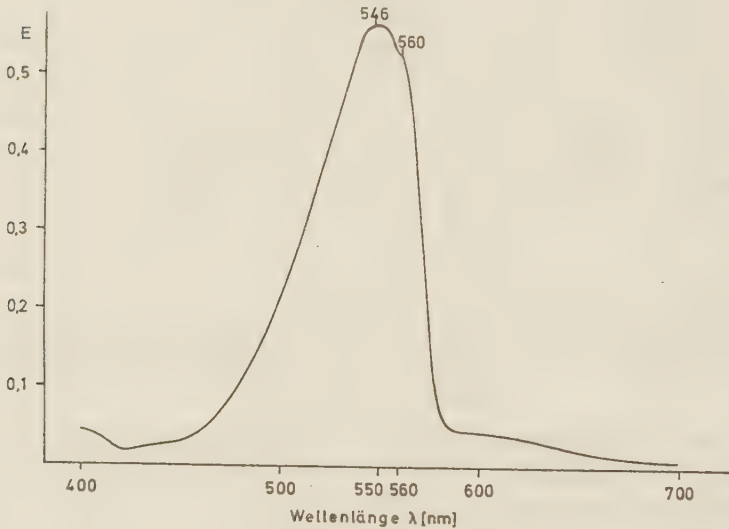


Abb. 25: Absorptionsspektrum des Phycoerythrins aus *Phormidium autumnale* nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Elution in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0.

In diesem Zusammenhang interessiert die Frage, wie weit sich das Phycoerythrin abbauen kann und wie das spektroskopisch zu charakterisieren ist. O'hEOCHA (96) zeigte, daß die Einwirkung von Trypsin auf Phycoerythrin einen Effekt hervorruft, der dem autolytischen Typ entspricht. Deshalb wurde dieses eluierte Phycoerythrin mit Trypsin versetzt und die spektrale Veränderung beobachtet. Grundsätzlich gingen die noch zu erkennenden Maxima in den Extinktionen zurück, übrig blieb eine leichte Erhebung bei 520 nm. Dieses vollständig abgebaute Produkt zeichnete sich auf der Elektrophorese durch eine übergroße Mobilität der noch zu erkennenden roten Zone aus. Diese Zone lief fast in der Bromphe-

molblaubande und hatte eine Mobilität von 0,69.

Nach diesen Untersuchungen war es fraglich, ob das eluierte Phycoerythrin bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes nur Artefakte ergab. Wie in Tabelle 3 auf Seite 29 zu ersehen, haben nur die Nebenzonen des eluierten Phycoerythrins nach der Fokussierung einen relativ hohen pI-Wert. Spektrale Messungen beider bei der Fokussierung entstandenen Zonen bestätigen die Beobachtung der gelelektrophoretischen Auftrennung. Beide Zonen entsprachen nicht mehr dem aufgetragenen Phycoerythrin und zeigten deutliche Abbauerscheinungen.

Es erhob sich nun die Frage, ob das Doppelmaximum im frischen Rohextrakt eventuell dadurch zustande kam, daß dieses Phycoerythrin bereits teilabgebaut in der Zelle vorlag.

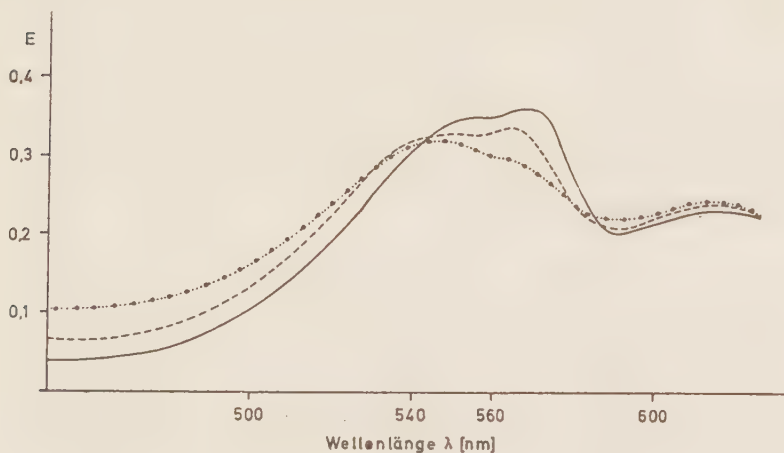


Abb. 26: Absorptionsspektrum des 1 : 10 verdünnten Rohextraktes aus *Phormidium autumnale* (C5). — Rohextrakt; -- Rohextrakt nach Trypsinzugabe, nach zehn Minuten gemessen; ••• Rohextrakt nach Trypsinzugabe, nach zwanzig Minuten gemessen.

Für diese Untersuchung wurde der frische Rohextrakt mit Trypsin versetzt und spektroskopisch und gelelektrophoretisch unter-

sucht. Hierbei fand man bei einer allgemeinen Extinktionsabnahme die Verschiebung der beiden Maxima in den kürzerwelligen Bereich (Abb. 26).

Der Abbautyp entspricht demjenigen eines normalen C-Phycoerythrins. Nach dreißig Minuten Trypsineinwirkung auf den Rohextrakt war nur noch ein breitgezogenes Maximum bei 540 nm zu erkennen. Das Maximum bei 570 nm trat nur noch in Form einer Schulter auf. Die Tris-Glycinelektrophorese dieses Produktes ließ für das Phycoerythrin eine langgestreckte Zone erkennen, die mit hoher Mobilität über das Phycocyanin hinauslief. Um sicher zu gehen, daß die spektralen Veränderungen des eluierten Phycoerythrins nicht auf der elektrophoretischen Methode beruhen, wurde das Phycoerythrin nach Ammoniumsulfatfällung säulenchromatographisch isoliert. Abbildung 27 zeigt das Elutionsdiagramm der erhaltenen Fraktionen. Das vorauslaufende Phycoerythrin (Fraktion 33 - 35) entsprach einem typischen Proteolyseprodukt mit den Maxima bei 540 nm und 560 nm. Die Phycoerythrinhauptfraktionen (45 - 65) enthielten die beiden Rohextraktmaxima, jedoch nach 548 nm und 564 nm verschoben. Das Absorptionsspektrum dieser Fraktionen war vergleichbar mit den Werten des eluierten Produktes (Tabelle 11).

Tabelle 11: λ -Maximum des *Phormidium autumnale* (C5) Phycoerythrin.

Rohextrakt nm	PE eluiert nm	PE Säule nm	PE II Säule nm
552 und 570	546 und 560	548 und 564	540 und 560

Vorliegende Untersuchung des *Phormidium autumnale* (C5) Phycoerythrins beinhaltet primär eine spektrale Besonderheit innerhalb der Phycoerythrin synthetisierenden Cyanobakterien. Nur die Rohextraktabsorptionsmaxima sind mit den von HIROSE et al. (63) angegebenen Werten aus *Oscillatoria princeps* var. minor vergleichbar. Allerdings handelt es sich bei diesen Autoren nicht



Abb. 27: Elutionsdiagramm der säulenchromatographischen Isolierung von Phycoerythrin aus Phormidium autumnale auf DEAE-Cellulose. 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8,0; KCl-Gradient (0 ~ 0,3 M). x--x E₅₆₀ nm Phycoerythrin; o--o E₆₂₀ nm Phycocyanin.

um eine Reinisolierung ihres Pigmentes sondern um Absorptionsdaten nach 40 % Ammoniumsulfatfällung. Die Absorptionswerte unseres Pigmentes sind auch nach Isolierung durch zwei voneinander unabhängige Methoden mit dem B-Phycoerythrin aus Rotalgen nicht vergleichbar. Während die isoelektrischen Punkte dieses Phycoerythrins, im Vergleich mit anderen Cyanobakterien, nur bei den wahrscheinlich degradierten Nebenzonen einen Unterschied aufweisen, liegen die Molekulargewichte der Untereinheiten deutlich unter denjenigen anderer Phycoerythrine (vgl. S. 38).

5. Immunologischer Vergleich von Phycoerythrin aus verschiedenen Cyanobakterien mit Hilfe des Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-Antiserum

Zur genauen Charakterisierung der Phycoerythrine und deren Proteolyseprodukte wurden immunologische Methoden herangezogen. Führt man einem Organismus einen Fremdstoff zu, so kann es in ihm zu Abwehrmaßnahmen kommen, die in der Ausbildung von Substanzen bestehen, durch welche die zugeführten Fremdstoffe unschädlich gemacht werden. Exogene Stoffe, die eine solche Abwehrreaktion verursachen sind Antigene, die gebildeten Schutzstoffe Antikörper. Grundlage für die äußerst empfindlichen und spezifischen immunologischen Methoden ist die Kreuzreaktion verschiedener Antigene mit den Antikörpern aus einem Organismus. Zum Vergleich der Phycoerythrine aus verschiedenen Cyanobakterienspecies wurden insbesondere drei Methoden angewendet. Neben dem qualitativen Immundiffusionstest verwendeten wir die quantitative Präzipitationsanalyse und den Phagentest. Immundiffusionstest und Präzipitationsanalyse unterscheiden sich vom Phagentest hinsichtlich ihrer Spezifität. Während bei den ersten beiden Verfahren die heterologen Antigene multivalent sein müssen, ist es mit Hilfe chemisch modifizierter Bakteriophagen möglich, zwischen einer kleinen Anzahl, oder sogar zwischen einer einzelnen von determinanten Gruppen zu unterscheiden (4). Alle für den immunologischen Vergleich verwendeten Phycoerythrine

sind auf Seite 31 aufgeführt.

5.1. Herstellung von Antikörper gegen C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173

Zur Gewinnung von Antikörper gegen C-Phycoerythrin wurden drei Kaninchen mit dem durch Elektrophorese gereinigten Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 immunisiert. Nach zehn Wochen erhielten alle Sera der Tiere Phycoerythrinantikörper. Abbildung 28 zeigt die quantitative Immunpräzipitationskurve des für alle Untersuchungen verwendeten Serums von einem der Tiere.

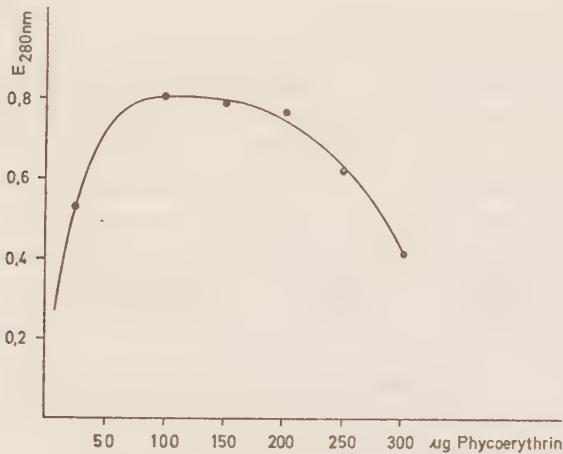


Abb. 28: Quantitative Immunpräzipitation von monomerem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin mit den homologen Antikörper. Zu steigenden in PBS-Puffer gelösten Mengen Phycoerythrin wurden 0,1 ml Serum gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C und zwölfstündigem Aufbewahren bei 4° C wurde der Niederschlag abzentrifugiert, in 0,1 M Natronlauge gelöst und die Extinktion bei 280 nm gemessen.

5.2. Doppeldiffusion nach Ouchterlony

Der Ouchterlonytest (100) besteht in einer Weiterentwicklung des Testes nach OUDIN (101). Während bei OUDIN die lineare Diffusionsgeschwindigkeit einer antigenhaltigen Lösung in einem antiserumhaltigen Gel untersucht wird, kann man mit Hilfe der Ouchterlonymethode durch Doppeldiffusion zwei verschiedene Antigene gleichzeitig vergleichen. Der wesentliche Unterschied zu OUDIN besteht darin, daß sowohl Antigen, als auch Antikörper im Gel aufeinander zu diffundieren. In beiden Fällen entstehen dort, wo Antigen und Antiserum aufeinandertreffen, Präzipitationslinien, die im Ouchterlonytest ein charakteristisches Aussehen besitzen. Aufgrund der Präzipitationsbanden kann man vier Grundtypen unterscheiden, die in Abbildung 29 dargestellt sind.

Grundsätzlich zeigten alle Phycoerythrine aus den verschiedenen Cyanobakterien mit dem Antiserum von Pseudanabaena W 1173 eine Präzipitationsreaktion. Keine Reaktion erhielt man mit den Phycocyaninen und den Rohextrakten von vollkommen adaptierenden Algen nach Rotlichteinstrahlung (vgl. S. 88). Wo wenig Algenmaterial vorhanden oder das Phycoerythrin schwer zu isolieren war, wurden frische Rohextrakte verwendet. Tabelle 4 zeigt alle Cyanobakterien, die gegen das Pseudanabaena W 1173 Antiserum getestet wurden.

Bei allen Diffusionsuntersuchungen fanden wir Typ I; III; IV. Typ II wurde nicht beobachtet.

Typ I wurde dann beobachtet, wenn die C-Phycoerythrine aus allen Species gegen das Antiserum von Pseudanabaena W 1173 diffundierten. Daraus ergibt sich, daß hier eine große Anzahl gemeinsamer Determinanten vorhanden sein muß.

Typ III trat dann auf, wenn die Phycoerythrine aus verschiedenen Algen mit dem homologen Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin verglichen wurden. Die in allen Fällen beobachtete Spornbildung des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins über die anderen deutet auf spezifische Determinanten hin, die nur in diesem Phycoerythrin vorkommen.

Typ IV war charakteristisch für bereits proteolytisch degradier-

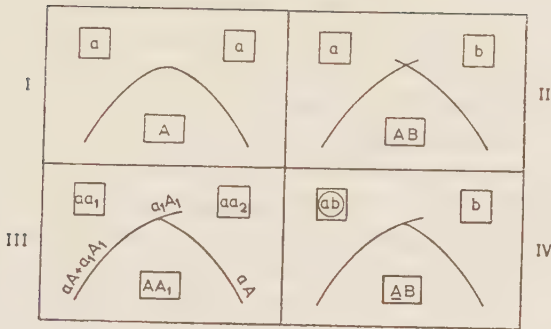


Abb. 29: Grundtypen der Präzipitationsbanden.

a;b nicht verwandte Antigenfaktoren; A,B spezifische Antikörper; a_1, a_2 mit a verwandte Antigenfaktoren; ab ein Antigenpartikel hat zwei spezifische Gruppen.

Typ I: Fusionierende Linie = sehr hohe antigene Identität

Typ II: Überkreuzung der Präzipitationslinie = keinerlei serologische Verwandtschaft zweier Antigene

Typ III: Spornbildung = partielle Identität; aufgrund der gemeinsamen Determinanten tritt Fusion auf. Die spezifischen Antikörper diffundieren über die Barriere und reagieren mit homologem Antigen.

Typ IV: Hemmtyp = verliert von gleichen Antigenen das eine bestimmte Faktoren, z.B. durch Proteolyse, so ergibt sich ein überdurchschnittlich großer, spornähnlicher Fortsatz (vgl. S. 51).

te Proteine, wie sie bei allen Phycoerythrin vorkamen, die im Absorptionsspektrum das typische Maximum bei 540 nm und 560 nm zeigten. Zu erwähnen bei dieser Erscheinung ist die Beobachtung, daß der entstandene Sporn überdurchschnittlich groß war. Ebenfalls war dieser Typ bei den durch Trypsin veränderten Phycoerythrin klar festzustellen. Auch das mit Trypsin veränderte

homologe Phycoerythrin zeigte diese Erscheinung. Ein Charakteristikum der autolytisch abgebauten Phycoerythrine, wie sie während der Isolierung auftraten, war eine Präzipitatsbildung von zwei Zonen, die verschieden schnell diffundierten. Im Falle von Phormidium persicinum waren die Zonen gleich stark, wohingegen bei Pseudanabaena W 1173 die schnellere Zone leicht diffus war (vgl. S. 50). Die isolierten Untereinheiten* des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins ergaben folgendes Bild (vgl. Abb. 30): Die α -Kette diffundiert in zwei Präzipitationslinien; eine diffuse, nahe der Antiserumvertiefung und eine scharfe, nahe der Antigenvertiefung. Möglicherweise ist das Lyophilisat der α -Kette nach Isolierung instabil. Die sich bildenden Spaltprodukte ergeben dann ein doppelliniges Immunpräzipitat. Die β -Kette bestand aus einer einzig scharfen Zone, die, verglichen mit der α -Kette, insgesamt nicht so weit diffundierte.



Abb. 30: Ouchterlonydoppeldiffusionspräzipitate der Pseudanabaena W 1173 Untereinheiten (je 0,1 mg/ml in PBS). Auswertung nach zwei Tagen.

5.3. Phagentest

5.3.1. Prinzip des Phagentestes und Anwendungsmöglichkeiten

Chemisch modifizierte Bakteriophagen sind Viren, an die Substanzen oder Haptene kovalent gekoppelt sind. Die nach der Kopplung überlebenden Bakteriophagen behalten hierbei die Fähigkeit, ihre

* Proben wurden uns freundlicherweise von Herrn G. MUCKLE zur Verfügung gestellt.

Wirtsbakterien zu lysieren. Durch Inkubation mit homologen Antikörpern (gerichtet gegen die gekoppelten Substanzen) wird der Phage inaktiviert (80,56), d.h. durch Bewegungsunfähigkeit ist er nicht mehr in der Lage seine Wirtsbakterien zu lysieren. Diese Inaktivierung des Antigenbakteriophagenkonjugats kann durch freies Antigen oder Hapten gehemmt werden. Die Hemmkapazität eines kreuzreagierenden Antigens, bezogen auf das Homologe, ist ein Maß für strukturelle Ähnlichkeit. Diese Methode wurde so von verschiedenen Autoren zu quantitativen Bestimmungen von Insulin (56), Prostaglandin (29), Cytochrom C (33) und Lysozymen (83) verwendet. Im Falle der Lysozyme war es möglich mit Hilfe des Phagentestes Unterschiede von nur einer Aminosäure zu erkennen (102). Da der Ouchterlonytest nur eine grobe Beurteilung der Antigene zuließ, verwendeten wir deshalb den Phagentest. Abbildung 31 veranschaulicht das Grundprinzip des Phagentestes.

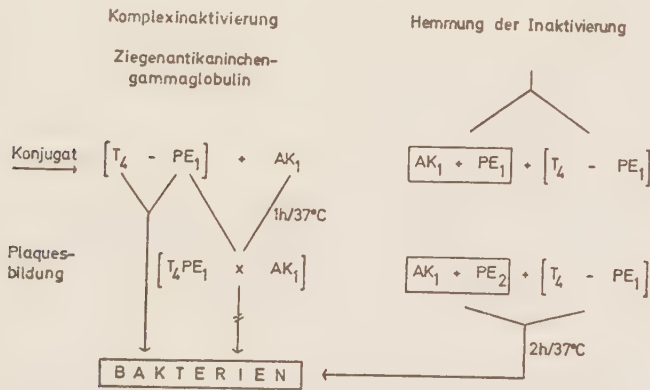


Abb. 31: Prinzip des Phagentestes.

$T_4 - PE_1$ = Phagenkonjugat mit dem homologen Phycoerythrin;
 AK_1 = homologe Antikörper zu Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin;
 PE_2 = Phycoerythrine aus verschiedenen Cyanobakterien.

5.3.2. Herstellung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates

Wie sich aus Abbildung 31 ergibt, war es zunächst notwendig ein Bakteriophagenkonjugat herzustellen. Hierzu wurde, in Anlehnung an eine Methode von HAIMOVICH et al. (55), das gelelektrophoretisch isolierte monomere Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin mittels Glutardialdehyd, als bifunktionellem Reagenz, an T_4 -Bakteriophagen gekoppelt. 0,02 % der eingesetzten Phagen überlebten die Kopplung (vgl. Methodischer Teil).

5.3.3. Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum

Die Untersuchung der Inaktivierung hatte einerseits die genaue Ermittlung der Plaques-Zahlen (PFU) zum Ziel, bei der 100 % phycoerythrinmodifizierte Phagen überlebten, andererseits sollte bestimmt werden, bei welcher Antiserumverdünnung 95 % Bakteriophagen inaktiviert wurden. Die Inkubation des Phagenkonjugates mit Antiserum erfolgte in zwei Schritten. Nach einer groben Inaktivierung folgte eine feine, die sich durch Zwischenwerte in der Antikörperkonzentration auszeichnete. Tabelle 12 stellt das Ergebnis der feinen Inaktivierung dar. Aus je drei Platten der gleichen Antikörperverdünnung wurden die gemittelten Plaques-Zahlen mit zwanzig multipliziert und die in Abbildung 32 dargestellte Inaktivierungskurve aufgestellt. Hierbei wurde für 100 % überlebende Phagen eine Plaques-Zahl von 12 300 festgesetzt. Abbildung 33 zeigt die Bestimmung des 95 % - Punktes, wobei die in Tabelle 12 aufgeführten Plaques-Zahlen, bezogen auf 12 300 (100 %), in Prozent umgerechnet wurden. Der 95 % - Punkt lag somit genau bei einer Antikörperkonzentration von 10^{-4} . Alle Inaktivierungsversuche wurden mit Hilfe der Komplexinaktivierung (52,70) durchgeführt (vgl. Methodischer Teil). Sowohl das Ziegenantiserum gegen Kaninchengammaglobulin als auch das reine Antiphycoerythrinantiserum, inaktivierten die unmodifizierten Bakteriophagen nicht.

Tabelle 12: Auswertung der feinen Inaktivierung.

Antikörper- verdünnung	Platte 1	Platte 2	Platte 3	MW	P.F.U./ ml	% Über- lebende
10^{-2}	(102)*	152	140	146	2920	23,7
6×10^{-3}	112	122	108	114	2280	18,5
10^{-3}	(36)*	53	55	54	1080	8,7
8×10^{-4}	50	10	27	29	580	4,7
6×10^{-4}	6	13	10	10	200	1,6
4×10^{-4}	10	6	7	8	160	1,3
2×10^{-4}	24	26	28	26	520	4,2
10^{-4}	35	26	41	34	680	5,0
8×10^{-5}	34	45	35	38	760	6,1
6×10^{-5}	41	58	50	50	1000	8,1
4×10^{-5}	65	111	91	89	1780	14,7
10^{-5}	129	182	(323)*	156	3120	25,3
8×10^{-6}	258	231	(152)*	243	4860	39,5
6×10^{-6}	351	335	(262)*	343	6860	55,7
4×10^{-6}	381	460	411	417	8340	67,8
2×10^{-6}	(380)*	528	564	546	10920	88,7
10^{-6}	587	537	667	597	11940	97,0
6×10^{-7}	622	674	715	670	13400	100,0
3×10^{-7}	557	(195)*	610	583	11660	100,0

100 % Überlebende $\hat{=}$ 12 300 P.F.U./ml; 95 % Hemmung $\hat{=}$ 10^{-4} Antikörperverdünnung.

*) Die in Klammer gesetzten Werte wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

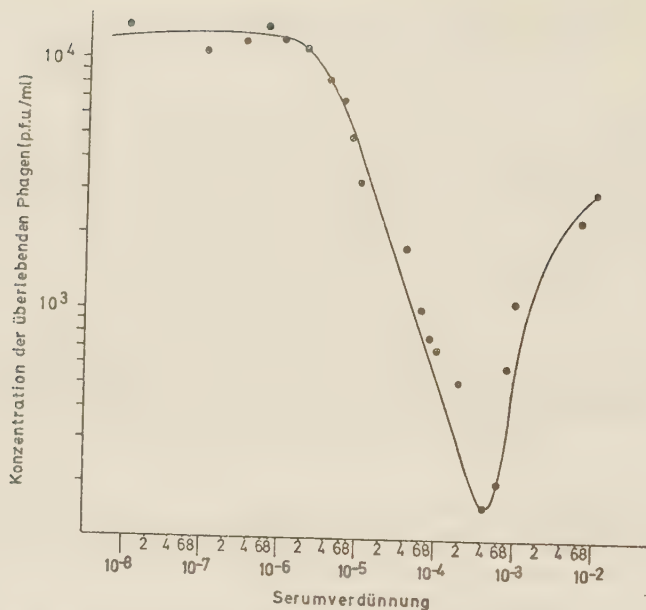


Abb. 32: Feine Inaktivierung des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates mit Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum.

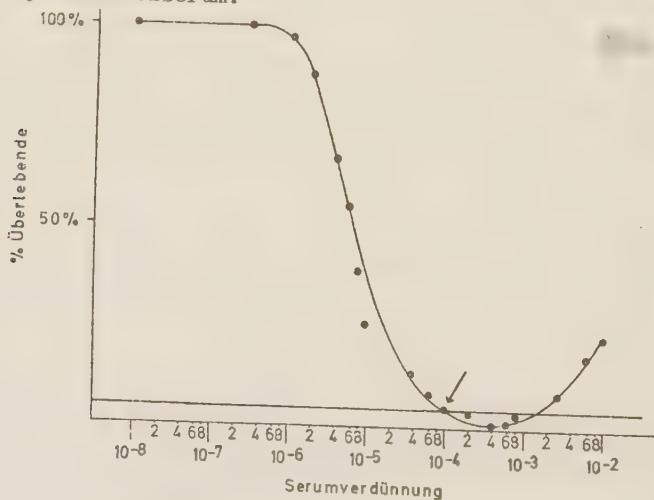


Abb. 33: Bestimmung des 95 % - Punktes. Erklärung im Text.

5.3.4. Hemmung der Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum mit freiem Phycoerythrin

Die Bestimmung der Hemmung der Inaktivierung setzt sich aus drei parallelen Arbeitsgängen zusammen: 1. Erstellung der Eichgerade (Abb. 34 a); 2. Erstellung der Hemmkurve des homologen Phycoerythrins; 3. Erstellung der Hemmkurve des zu vergleichenden Phycoerythrins.

Wie bei den Inaktivierungsversuchen, so wurde auch hier zunächst eine grobe (vgl. Methodischer Teil) und dann eine feine Hemmung der Inaktivierung durchgeführt. Tabelle 13 zeigt die Auswertung von Eich- und Hemmkurve der feinen Hemmung der Inaktivierung des homologen Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins. Die von der Hemmkurve erhaltenen Plaques-Zahlen wurden auf die Eichkurve übertragen und die entsprechende Antikörperkonzentration abgelesen. Hieraus ergaben sich die Inaktivierungs- bzw. die Hemmwerte in Prozent. Abbildung 34 b zeigt die Hemmkurve des homologen Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins nach Auswertung der Tabelle 13. Als Vergleichskriterium für alle untersuchten Phycoerythrine galt die Hemmkapazität, ausgedrückt im 50 % - Punkt. Dieser gibt an bei welcher PhycoerythrinKonzentration 50 % Bakteriophagen inaktiviert werden. Jeder Vergleich mit einem heterologen Phycoerythrin bedingte eine neue Eich- und Hemmkurve des homologen Phycoerythrins, um Schwankungen im 50 % - Punkt des Bezugsproteins zu berücksichtigen.

Zum Vergleich der Hemmkapazitäten wurden die auf Seite 30 elektrophoretisch isolierten Phycoerythrine verwendet, ausgehend von einer Stammlösung von 1 mg/ml. Tabelle 14 zeigt die 50 % - Punkte aus drei Einzelmessungen. Die letzte Spalte enthält die Mittelwerte, berechnet auf $\mu\text{g/ml}$ Phycoerythrin.

Tabelle 13: Feine Hemmung der Inaktivierung.

a) Eichkurve

AK.- Verd.				MW	P.F.U./ ml
10^{-4}	48	39	(99)*	44	880
6×10^{-5}	63	62	64	63	1260
3×10^{-5}	127	145	123	131	1620
10^{-5}	(304)*	214	277	246	4920
6×10^{-6}	343	306	341	330	6600
3×10^{-6}	437	462	443	447	8940
10^{-6}	422	420	447	430	8600

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

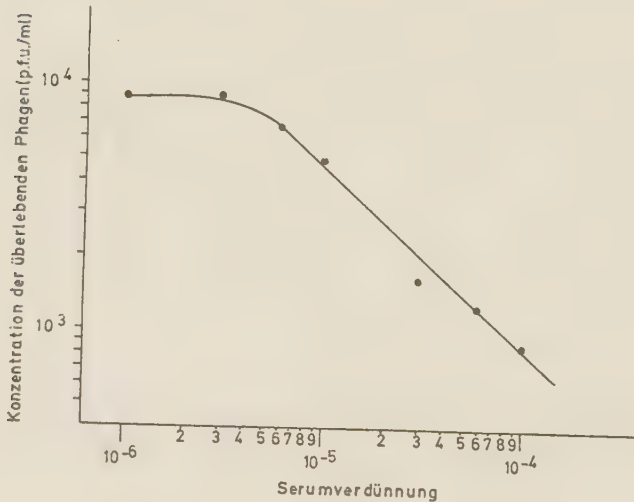


Abb. 34 a: Eichkurve zur Hemmung der Inaktivierung des homologen Phycoerythrins.

Tabelle 13: Feine Hemmung der Inaktivierung.

b) Hemmkurve

AG.-				MW	P.F.U./	AK.d.	% v.10 ⁻⁴	%
Verd.					ml	Eichk.	Inaktiv.	Hemmung
10 ⁻¹	461	432	403	432	8640	10 ⁻⁶	0	100
10 ⁻²	(295)*	346	352	349	6980	5,6x10 ⁻⁶	5	95
6x10 ⁻³	(339)*	242	261	251	5030	6,9x10 ⁻⁶	7	93
3x10 ⁻³	(323)*	237	228	232	4650	10 ⁻⁵	10	90
10 ⁻³	223	(154)*	210	217	4340	10 ⁻⁵	10	90
6x10 ⁻⁴	75	82	70	75	1500	4,4x10 ⁻⁵	45	55
3x10 ⁻⁴	66	53	65	61	1220	6,0x10 ⁻⁵	60	40
10 ⁻⁴	42	39	33	38	760	10 ⁻⁴	100	0

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

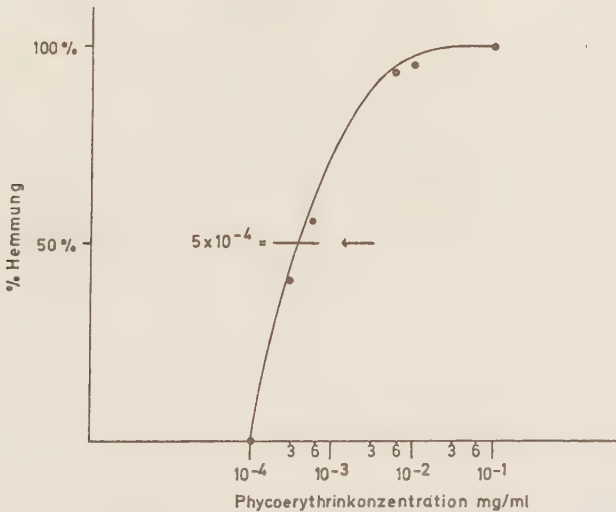


Abb. 34 b: Hemmkurve des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins. Der 50 % - Punkt liegt bei einer Antigenkonzentration von 5×10^{-4} mg/ml.

Tabelle 14: Hemmung der Inaktivierung verschiedener C-Phycoerythrine, bezogen auf 1 mg/ml.

Alge	50 %	50 %	50 %	MW/mg/ml
<i>Pseudanabaena</i> W 1173	3 x 10 ⁻⁴	6 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁴	0,34 x 10 ⁻³
<i>Fremyella diplosiphon</i>	8 x 10 ⁻⁴	9 x 10 ⁻⁴	8 x 10 ⁻⁴	0,83 x 10 ⁻³
<i>Pseudanabaena catenata</i>	1,6 x 10 ⁻³	9 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻³	1,51 x 10 ⁻³
<i>Aphanocapsa</i> 6701	2 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻³	9 x 10 ⁻⁴	1,50 x 10 ⁻³
<i>Tolypothrix tenuis</i>	3 x 10 ⁻³	2,5 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	2,50 x 10 ⁻³
<i>Phormidium persicinum</i>	2 x 10 ⁻³	2,5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻³	3,10 x 10 ⁻³
<i>Nostoc muscorum</i> A	5 x 10 ⁻³	3 x 10 ⁻³	4 x 10 ⁻³	4,00 x 10 ⁻³

Tabelle 15: Hemmung der Inaktivierung verschiedener Rohextrakte E_{560 nm} = 0,1.

Alge	50 %	50 %	50 %	MW
<i>Pseudanabaena</i> W 1173	5 x 10 ⁻³	1,6 x 10 ⁻²	2,5 x 10 ⁻²	15 x 10 ⁻³
<i>Pseudanabaena catenata</i>	2 x 10 ⁻²	2 x 10 ⁻²	2,5 x 10 ⁻²	21 x 10 ⁻³
<i>Tolypothrix tenuis</i>	3 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻²	3 x 10 ⁻²	27 x 10 ⁻³
<i>Phormidium persicinum</i>	2 x 10 ⁻²	6 x 10 ⁻²	4 x 10 ⁻²	40 x 10 ⁻³
<i>Fremyella diplosiphon</i>	4 x 10 ⁻³	9 x 10 ⁻²	4,5 x 10 ⁻²	46 x 10 ⁻³
<i>Aphanocapsa</i> 6701	7 x 10 ⁻²	9 x 10 ⁻²	5 x 10 ⁻²	70 x 10 ⁻³
<i>Nostoc muscorum</i> A	3,5 x 10 ⁻²	2,5 x 10 ⁻¹	1,3 x 10 ⁻¹	138 x 10 ⁻³

Aus der Betrachtung der Werte geht hervor, daß innerhalb der getesteten Phycoerythrine signifikante Unterschiede gefunden wurden. Das Phycoerythrin aus Fremyella diplosiphon scheint demnach dem homologen Phycoerythrin am ähnlichsten zu sein, wobei die Hemmkapazität etwa zweifach schlechter ist. Das Phycoerythrin von der Nostocalen Pseudanabaena catenata und der Chroococcalen Aphanocapsa 6701 kann mit Hilfe des Phagentestes nicht unterschieden werden. Beide hemmen ungefähr fünfmal schlechter als das Bezugsprotein. Die Phycoerythrine aus Tolypothrix tenuis, Phormidium persicinum und Nostoc muscorum A zeigen sogar noch weniger Kreuzreaktion, wobei Nostoc Phycoerythrin zwölfmal schlechter hemmt als das Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin.

Weiterhin wurde versucht die Hemmaktivität der C-Phycoerythrin haltigen Rohextrakte im Phagentest zu bestimmen. Hierzu wurden die frisch hergestellten Rohextrakte bei 560 nm auf eine Extinktion von 0,1 eingestellt. Die Mittelwerte aus drei Bestimmungen sind in Tabelle 15 dargestellt. Wie bei den reinen Phycoerythrin so ergeben sich auch hier, bezogen auf das homologe Phycoerythrin, generell schlechtere Hemmwerte. Allerdings verändert sich, durch unterschiedliche Hemmkapazität bedingt, die Reihenfolge. So kommen die Rohextrakte von Pseudanabaena catenata und Tolypothrix tenuis dem Pseudanabaena W 1173 Rohextrakt am nächsten. Ungefähr dreifach schlechter hemmen die Rohextrakte von Phormidium persicinum und Fremyella diplosiphon. Knapp fünffach schlechter hemmt der Rohextrakt der Aphanocapsa 6701. Der um das Neunfache schlechter hemmende Nostoc muscorum A Rohextrakt ist in der Reihenfolge übereinstimmend mit dem reinen Phycoerythrin. Die offensichtlich schlechtere Hemmwirkung der Rohextrakte könnte darin begründet sein, daß die Phycoerythrine in den Rohextrakten höher aggregiert vorliegen und somit ein Teil der determinanten Gruppen verdeckt ist, sodaß er nach Antikörperzugabe nicht inaktiviert wird.

5.3.5. Hemmung der Inaktivierung eines partiell trypsinabgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins

Dieser Versuch sollte zeigen, inwieweit sich die Hemmkapazität

eines partiell trypsinabgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins bei genau definierten Abbaubedingungen verändert. Nach einer zwanzigminütigen Einwirkung von Trypsin auf Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin zeigte sich jedoch, daß die Hemmung der Inaktivierung des partiell abgebauten Phycoerythrins im Vergleich mit dem intakten Protein gleich gut war. Nach Tabelle 15 und den Abbildungen 35 b und 35 c entsprachen beide 50 % - Punkte einer Antigenkonzentration von 10^{-3} . Es erhob sich nun die Frage inwieweit dieses Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin überhaupt abgebaut war. Deshalb wurde dieses Produkt sowohl im Ouchterlonytest, als auch mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese charakterisiert. Übereinstimmend mit den auf Seite 50 beschriebenen Ouchterlonyergebnissen degradierteter Phycoerythrine fand man auch hier einen Ansatz von zwei dicht aufeinanderfolgenden Präzipitationsbanden (Abb. 36).

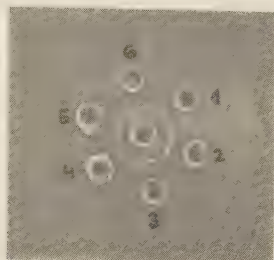


Abb. 36: Ouchterlonytest von partiell trypsinabgebautem und intaktem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin. 1,2,3 Intaktes PE (1 mg/ml PBS), aufgetragen 20 μ l; 5,6 partiell abgebautes PE (1 mg/ml PBS), aufgetragen 20 μ l; 4 partiell abgebautes PE (1 : 10 verdünnt), aufgetragen 20 μ l.

Die der Antiserumöffnung zugekehrte Präzipitationslinie ging mit derjenigen des intakten Phycoerythrins ineinander über. Das äußere Präzipitat war an den Ecken deutlich abgesetzt. Eine Spornbildung war nicht zu beobachten. Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten des partiell trypsinabgebauten Phycoerythrins ist auf Seite 52 beschrieben.

Tabelle 15: Hemmung der Inaktivierung des trypsinabgebauten Phycoerythrins.

a) Eichkurve

AK.- Verd.				MW	P.F.U./ ml
10^{-4}	21	31	42	31	620
6×10^{-5}	58	53	(65)*	56	1120
3×10^{-5}	136	125	140	133	2660
10^{-5}	223	330	192	248	4960
6×10^{-6}	(422)*	312	328	320	6400
3×10^{-6}	352	319	(279)*	335	6700
10^{-6}	361	382	(335)*	371	7420

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

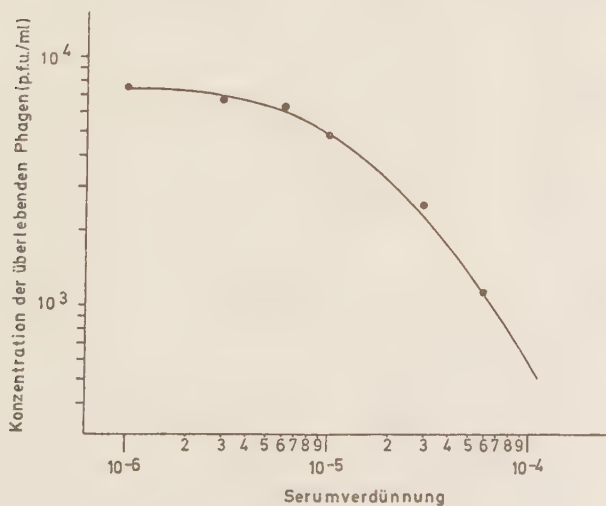


Abb. 35 a: Eichkurve zur Hemmung der Inaktivierung des partiell trypsinabgebauten Phycoerythrins aus Pseudanabaena W 1173.

Tabelle 15: Hemmung der Inaktivierung des trypsinabgebauten Phycoerythrins.

b) Hemmkurve

AG.- Verd.				MW	P.F.U./ ml	AK.d. Eichk.	% v. 10^{-4} Inaktiv.	% Hemmung
10^{-1}	(280)*	301	315	308	6160	$5,4 \times 10^{-6}$	5	95
10^{-2}	(204)*	260	271	265	5300	$8,2 \times 10^{-6}$	8	92
6×10^{-3}	217	207	207	210	4200	$1,3 \times 10^{-5}$	13	87
3×10^{-3}	165	163	(184)*	164	3280	$2,0 \times 10^{-5}$	20	80
10^{-3}	50	60	53	54	1080	$6,2 \times 10^{-5}$	62	38
6×10^{-4}	49	27	33	36	720	$8,4 \times 10^{-5}$	84	16
3×10^{-4}	33	(43)*	36	35	700	$8,5 \times 10^{-5}$	85	15
10^{-4}	14	22	38	25	500	$< 10^{-4}$	100	0
10^{-5}	(37)*	23	23	23	460	$> 10^{-4}$	100	0

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

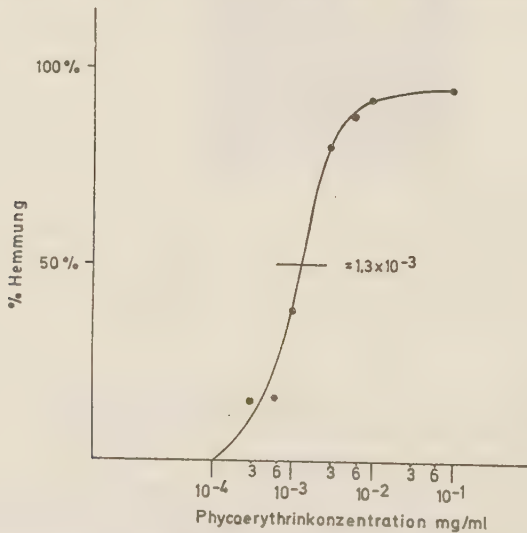


Abb. 35 b: Hemmkurve des homologen Phycoerythrins.

Tabelle 15: Hemmung der Inaktivierung des trypsinabgebauten Phycoerythrins.

c) Trypsinabbau

AG.- Verd.	MW				P.F.U./ ml	AK.d. Eichk.	% v. 10^{-4} Inaktiv.	% Hemmung
10^{-1}	307	300	290	299	5980	$6,2 \times 10^{-6}$	6	94
6×10^{-2}	254	269	252	258	5160	$9,0 \times 10^{-6}$	9	91
3×10^{-2}	228	225	225	226	4520	$1,2 \times 10^{-5}$	12	88
10^{-3}	72	63	84	73	1460	$5,0 \times 10^{-5}$	50	50
10^{-4}	(42)*	24	28	26	520	10^{-4}	100	0

*) Der eingeklammerte Wert wurde bei der Berechnung vernachlässigt.

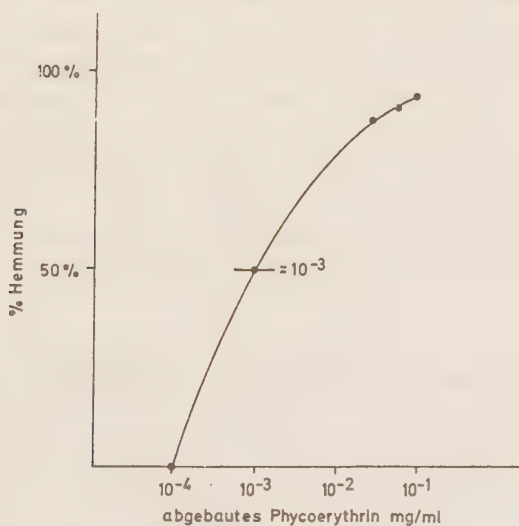


Abb. 35 c: Hemmkurve des partiell trypsinabgebauten Phycoerythrins.

Nur zwei der angewandten Methoden charakterisieren den Grad des durch Trypsineinwirkung abgebauten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins. Die gleiche Hemmkapazität zwischen dem abgebauten und dem intakten Phycoerythrin sagt hierüber noch nichts aus, denn offensichtlich sind nach Trypsineinwirkung noch genug Determinanten vorhanden, die die gleiche Hemmung bewirken. Erste Anzeichen für eine Degradation ist die Doppeldiffusion der Präzipitationslinie. Die Determinanten der möglicherweise entstandenen Bruchstücke müßten demnach noch vollkommen intakt sein, was auch durch das Ausbleiben eines Spornes bestätigt wurde. Erst die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten zeigt, wo sich eine deutliche Veränderung ergeben hat. Aufgrund der angewandten Inkubationsbedingungen (20 Min. bei 37° C) kann man vermuten, daß sich die Ketten zumindest teilweise entfaltet haben. Offensichtlich hat das Trypsin jedoch nur die α -Kette angegriffen. Diese Feststellung kann zwei Ursachen haben: zum einen ist die α -Kette aus sterischen Gründen dem Trypsin leichter zugänglich, zum anderen könnte, da das Trypsin relativ spezifisch an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, die Zahl der basischen Aminosäuren auf der α -Kette größer sein als auf der β -Kette. Unterstützt würde letztere Vermutung durch die Beobachtung, daß sich bei normalen Bedingungen die α -Kette mit Coomassie-Blau stärker anfärbt und der anionisch vorliegende Farbstoff sich an mehr positiv geladene Aminogruppen anlagern kann.

5.5. Quantitative Präzipitationsreaktion heterologer Phycoerythrine mit Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum

Zur quantitativen Präzipitationsanalyse wurden die gleichen kreuzreagierenden Phycoerythrine wie zum Phagentest verwendet. Das Prinzip dieser Untersuchung besteht in der quantitativen Erfassung der Äquivalenzonen der heterologen Phycoerythrine, bezogen auf das homologe Protein, nach Zugabe von Antikörpern. So ist dieser Test eine grobe Bestimmung für die gemeinsamen Determinanten, bezogen auf das homologe Phycoerythrin (85). Gewöhnlich bestimmt man diese Äquivalenzonen, indem man den Überstand

nach Antikörperzugabe auf überschüssiges Antigen untersucht. Im Falle der Phycoerythrine wird dies erleichtert, da diese Proteine ein charakteristisches Absorptionsmaximum um 560 nm haben. Aus diesem Grund wurde das nicht präzipitierte Antigen im Überstand als Vergleichskriterium für die kreuzreagierenden Phycoerythrine aus verschiedenen Cyanobakterien gewählt. Wie aus Abbildung 37 hervorgeht, werden alle heterologen Phycoerythrine in der Zone von Antikörperüberschuß vollständig ausgefällt.

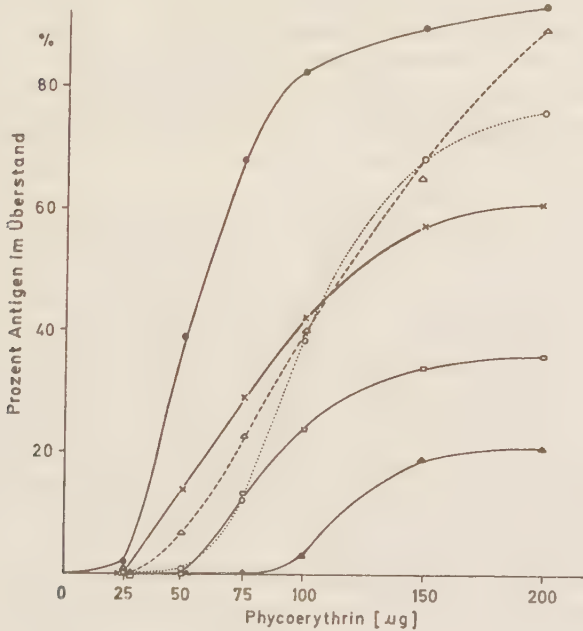


Abb. 37: Quantitative Präzipitationsreaktion heterologer Phycoerythrine aus verschiedenen Cyanobakterien. Zu steigenden Mengen Phycoerythrin wurden 0,1 ml Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum gegeben. ●--● Pseudanabaena W 1173; ▲--▲ Freymyella diplosiphon; ○--○ Aphanocapsa 6701; x--x Tolypothrix tenuis; □--□ Phormidium persicinum; ▲--▲ Pseudanabaena catenata.

Das Antikörper-Antigenverhältnis der heterologen Proteine ist im Äquivalenzbereich niedriger als beim homologen Phycoerythrin. Daraus kann man schließen, daß die heterologen Phycoerythrine eine kleinere Anzahl von Determinanten haben. Wie erwartet unterscheidet sich die Reihenfolge der kreuzreagierenden Phycoerythrine aus den verschiedenen Cyanobakterien von derjenigen, die im Phagentest aufgestellt wurde. Übereinstimmend mit dem Phagentest ist das Phycoerythrin aus Fremyella diplosiphon, das auch hier dem Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin sehr ähnlich zu sein scheint. Die Phycoerythrine aus Aphanocapsa 6701 und Pseudanabaena catenata zeigen verschiedene Präzipitationsverhalten, wohingegen sie im Phagentest nicht unterschieden werden können. Im Gegensatz zum Phagentest, wo sich die Phycoerythrine aus Tolypothrix tenuis und Aphanocapsa 6701 stark unterscheiden, wiesen sie in der Präzipitation eine größere Ähnlichkeit auf.

5.6. Gesamtbetrachtung der immunologischen Ergebnisse

Immunchemische Untersuchungen von kreuzreagierenden Proteinen haben in erster Linie den Zweck Informationen über strukturelle Merkmale zu erhalten. Weiterhin lassen sich etwaige phylogenetische und taxonomisch grobe Beziehungen erkennen. Der Vorteil immunologischer Methoden besteht darin, daß man ohne genaue Kenntnis von Proteinstrukturen Vergleiche anstellen kann. Das gegen Phycoerythrin hergestellt Antiserum von einer neu isolierten Pseudanabaena W 1173 diente als vergleichendes Agens für C-Phycoerythrin verschiedener Cyanobakterienspecies. Die Grundlage einer solchen Untersuchung ist die allgemein anerkannte Beziehung zwischen der Kreuzreaktion und den sequenziellen Ähnlichkeiten der zu vergleichenden Proteine. Sowohl von Phycocyanin, als auch von Phycoerythrin sind Totalsequenzen noch nicht bekannt. Derartige Untersuchungen beschränken sich auf Bestimmungen des N-Terminus und partieller Sequenzierung der Untereinheiten sowohl von Phycocyanin, als auch von Phycoerythrin, oder auf Sequenzierungen isolierter Peptide. So fanden beispiels-

weise HARRIS und BERNIS (58), daß sowohl die N-Termini, als auch die folgenden Aminosäuren der α -Ketten von Phycoerythrin und Phycocyanin fast identisch sind. Die Gesamtproteine zeigen jedoch untereinander keine Kreuzreaktion; BENNETT und BOGORAD (5) und GLAZER et al. (50). Daraus geht hervor, in Übereinstimmung mit MARGOLIASH et al. (82), daß die Korrelation zwischen Sequenz und Kreuzreaktion so nicht absolut anwendbar ist. Strukturelle Veränderungen sind nur dann zu erkennen, wenn sie als Determinanten auf der Oberfläche eines Proteins Immunogenität verursachen. Die bisher in der Literatur beschriebenen serologischen Verfahren zum Vergleich der Biliproteide beruhen ausschließlich auf der Interpretation von Präzipitationsbanden im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY. Wie MARGOLIASH et al. im Falle der Cytochromuntersuchungen zeigten, ist es sinnvoll, beim Vergleich kreuzreagierender Proteine mehrere Methoden anzuwenden. Die Präzipitationsanalyse oder die Komplementfixierung sind Methoden, die von einem multivalenten Antigen abhängig sind (103). Neutralisationstechniken dagegen bilden keine Gitter und zeigen bereits mit einer kleinen Zahl, oder sogar mit nur einer Determinante, Kreuzreaktion. Deshalb ist die Reihenfolge bei der Untersuchung von verwandten, kreuzreagierenden Proteinen in einem gewissen Grad von der verwendeten Methode abhängig. Die Phycoerythrine wurden deshalb durch drei voneinander unabhängige Methoden verglichen. Neben dem qualitativen Ouchterlonytest benutzte man die quantitative Präzipitationsreaktion und den speziell hierfür entwickelten Phagentest, der zu einer Neutralisationstechnik zu zählen ist. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, wobei sehr kleine Antigendifferenzen erkannt werden können. Die mit Hilfe des Phagentestes erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß diese Methode sehr wohl auch auf das Biliprotein Phycoerythrin anwendbar ist, und daß die immun-spezifische Inaktivierung der modifizierten Phagen bei einer extrem geringen Antiserumkonzentration (6×10^{-6}) erreicht wird, was wiederum auf die Empfindlichkeit der Methode hindeutet. Das-selbe gilt für die Hemmung der Inaktivierung, wobei der 50 % - Punkt des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins schon bei einer

Konzentration von 0,3 µg/ml erreicht wurde.

Obwohl der Präzipitationstest für die Erkennung geringer Antigenvarianten weniger geeignet ist, wird er häufig zum Vergleich von Proteinen herangezogen. Da er die heterologen Phycoerythrine nach dem Grad der Multivalenz vergleicht, benutzten wir ihn als Ergänzung zu den beiden anderen Methoden.

Der Vergleich der Ergebnisse, die durch die drei verschiedenen Methoden erhalten wurden, läßt folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Im Ouchterlonydoppeldiffusionstest muß man aufgrund der Präzipitationsbanden annehmen, daß einerseits alle Phycoerythrine einen Anteil gemeinsamer Determinantengruppen und andererseits Species-spezifische Gruppen besitzen. Die Annahme, daß eine große Zahl gemeinsamer Determinanten vorhanden ist, stimmt mit dem Phagentest überein. Wie aus Tabelle 14 zu ersehen, zeigen alle getesteten Phycoerythrine eine Hemmaktivität.

Ein weiterer Hinweis für eine große Anzahl gemeinsamer Determinanten kann auch aus dem Befund der quantitativen Präzipitation abgeleitet werden. Im Gegensatz zu vielen kreuzreagierenden Systemen, bei denen die heterologen Antigene unvollständig gefällt werden, präzipitierten alle Phycoerythrine im Bereich von Antikörperüberschuß vollständig. Dieser Befund paßt gut zu den Ergebnissen aus Ouchterlony- und Phagentest. Er läßt sich am besten dadurch erklären, daß eine große Anzahl gemeinsamer determinanter Gruppen, die auf der Proteinoberfläche sitzt, für die vollständige Präzipitation verantwortlich ist.

2. Die Menge an heterologem Phycoerythrin, die zum Erreichen des Äquivalenzbereiches notwendig ist, sollte einen groben Schluß auf die Anzahl kreuzreagierender Gruppen zulassen (119,85). Tatsächlich braucht man mehr heterologes Antigen, bezogen auf das homologe, um nicht präzipitiertes Phycoerythrin im Überstand zu finden. Das höhere Antikörper-Antigenverhältnis der homologen Reaktion im Vergleich mit den heterologen Reaktionen, kann durch eine zusätzliche Präzipitationskapazität der Antikörper erklärt werden, die gegen artspezifische Determinanten gerichtet sind.

3. Die Reihenfolge der kreuzreagierenden Phycoerythrine beim Phagentest stimmt nicht mit derjenigen vom Präzipitationstest überein. Diese Beobachtung kann man teilweise mit der spezifischeren Unterscheidungskraft des Phagentestes erklären. Vorliegende Daten der verschiedenen Untersuchungsmethoden zeigen, daß zu einer zuverlässigen Korrelierung kreuzreagierender Phycoerythrine mehr als nur eine immunologische angewendet werden muß.

6. Untersuchung des Adaptationsverhaltens verschiedener Cyanobakterien

Das Phänomen der chromatischen Adaptation bei Cyanobakterien wurde schon sehr früh beobachtet. Im Jahre 1902 veröffentlichte ENGELMANN (35) einen Bericht über die Versuche seines Schülers GAIDUKOV (43), daß die akzessorischen Pigmente bestimmter Cyanophyceen durch verschiedene Lichtqualitäten verändert werden können. Diese Beobachtung bezeichneten die Autoren mit komplementärer chromatischer Adaptation.

Von elf auf Adaptation untersuchten Algenspecies fand BORESCH (14) nur bei Phormidium faveolarum ein Adaptationsverhalten. DEMETER (25) bestätigte die Beobachtung von HARDER (57), daß zur Adaptation befähigte Cyanophyceen anscheinend sehr selten sind. Die bis dahin gefundenen Algenspecies ergaben sich aus Beobachtungen, wobei die Algen auf Nähragarböden wuchsen und mit einer Lichtquelle, der verschiedene Farbfilter vorgeschaltet waren, bestrahlt wurden.

Der Einfluß verschiedener Lichtqualitäten auf Blaualgen beschränkte sich auf Untersuchungen in neuerer Zeit an Tolypothrix tenuis und Fremyella diplosiphon (12). Beide Algen zeigen die komplementäre chromatische Adaptation. Außerdem bewirkte die Rotlichteinstrahlung bei beiden Organismen eine morphologische Veränderung. So sind Rotlichtfilamente beider Arten, verglichen mit Fluoreszenzlichtfilamenten kürzer, wobei die Einzelzellen nur im Rotlicht kugelförmig, anderenfalls langgestreckt sind. Erst die Untersuchungen von TANDEAU DE MARSAC (113) beinhalten die Verbreitung des Adaptationphänomens innerhalb der Cyano-

bakteriensystematik anhand von 44 Species.

Zur Frage des Adaptationsvermögens von Blaualgen deuten erstere Untersuchungen von DIAKOFF und SCHEIBE (27,28), FUJITA und HATTORI (40,41) an Tolypothrix tenuis und BOGORAD an Fremyella diplosiphon darauf hin, daß reversible Photorezeptorpigmente ähnlich, aber nicht identisch mit dem Chromoprotein Phytochrom das Verhältnis von Phycoerythrin zu Phycocyanin in adaptierenden Cyanobakterien regeln. BOGORAD bezeichnet derartige Pigmente als Adaptochrome (12). Nach Untersuchungen von BJÖRN und BJÖRN (11) an Tolypothrix tenuis, Tolypothrix disorta, Nostoc muscorum A und Phormidium luridum ergaben sich sogar drei verschiedene reversible Pigmentsysteme, die diese Autoren mit Phycochrom a, b, c bezeichneten.

Aus den Ergebnissen von HARDER ging damals schon hervor, daß der Lichtintensität eine besondere Bedeutung zukommt. Deshalb versuchten wir die Lichtintensitäten von Rot- und Grünlicht anzugleichen (vgl. Methodischer Teil). Außerdem wurde das Adaptationsverhalten an Algen untersucht, die nur auf Flüssigkulturen gewachsen waren.

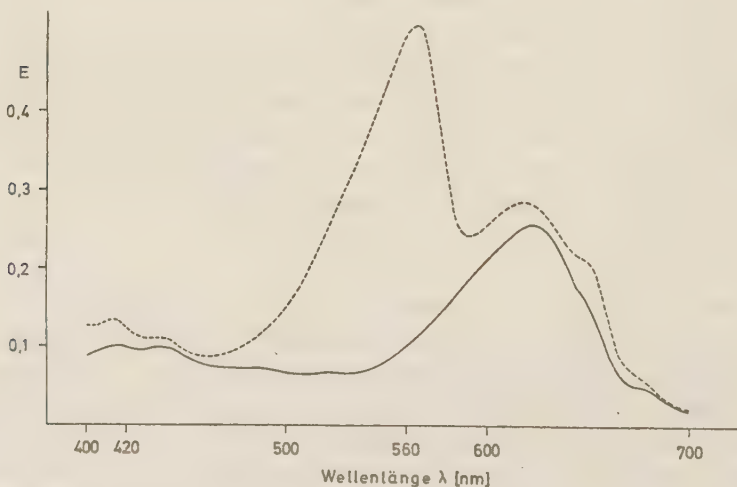


Abb. 38: Absorptionsspektren der 1 : 10 verdünnten Rohextrakte von *Anabaena variabilis*, einer totaladaptierenden Alge. -- Grünlichtrohextrakt; — Rotlichtrohextrakt.

Eine grobe Beurteilung über Adaptationsvermögen ergibt das jeweilige Absorptionsspektrum des Rohextraktes der bei Rot- und Grünlicht gewachsenen Algen, da die Biliproteine bei typischen Wellenlängen absorbieren (Abb. 38). Phycoerythrin ≈ 560 nm; Phycocyanin ≈ 620 nm und Allophycocyanin ≈ 652 nm. Die quantitative Auswertung erfolgte nach den Angaben von BENNETT und BOGORAD (6), mit welchen es möglich ist die Biliproteidkonzentrationen bereits im Rohextrakt zu erfassen. Tabelle 16 zeigt die verschiedenen Reizbeantwortungen der Cyanobakterienstämme nach Rot- und Grünlichteinstrahlung. Demnach lassen sich die untersuchten Stämme in fünf Gruppen einteilen: 1. Nicht adaptierende Cyanobakterien; 2. Totaladaptierende Cyanobakterien, kein Phycoerythrin im Rotlicht; 3. Teiladaptierende Cyanobakterien, Phycoerythrin im Rotlicht vermindert; 4. Cyanobakterien mit besonders wenig Phycocyanin und ungewöhnlicher Wellenlänge desselben; 5. Cyanobakterien, die nur Phycocyanin synthetisieren, erhöhten gleichzeitig das Allophycocyanin nach Rotlichteinstrahlung.

Tabelle 17: Biliproteidgehalt von nicht adaptierenden Cyanobakterien (Gruppe I); gemessen im Rohextrakt, berechnet nach BENNETT und BOGORAD (6).

Alge	Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge			Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge		
	Rotlicht			Grünlicht		
	PC	APC	PE	PC	APC	PE
<i>Dermocarpa violaceae</i>	0,21	0,16	0,30	0,21	0,15	0,31
<i>Lyngbya species</i> (C35)	0,31	0,12	0,10	0,57	0,22	0,20
<i>Phormidium autumnale</i> (C5)	0,52	0,32	0,84	0,52	0,36	0,86
<i>Phormidium persicinum</i>	0,29	0,16	2,00	0,33	0,17	2,20
<i>Phormidium species</i> (C8)	0,90	0,48	1,00	1,00	0,59	1,53
<i>Pseudanabaena</i> W 1173	0,72	0,53	1,48	0,75	0,58	1,54

Tab. 16: Reizbeantwortungen von Cyanobakterien nach Rot- und Grünlichteinstrahlung

ORDNUNG Species	Gruppe I Nichtadaptierende Cyanobakterien	Gruppe II Totaladaptierende Cyanobakterien	Gruppe III Teiladaptierende Cyanobakterien	Gruppe IV Adaptierende Cyanobakterien, P.E. bei außergewöhnl. Wellenlänge	Gruppe V Erhöhung der P.C.-Ausbeute von nur P.C. synth. Cyanobakterien
<u>CHROOCOCCALES</u>					
Aphanocapsa 6701			•		•
Anacystis nidulans					
<u>PLEUROCAPSALES</u>					
Dermocarpa violaceae	•				
<u>NOSTOCALES (HORMOGONALES)</u>					
Anabaena variabilis		•			
Calothrix parietina		•			
Premyella diplosiphon		•			
Lyngbya (C35)	•				
Nostoc muscorum A			•		•
Oscillatoria rubescens					
Phormidium ambiguum (C7)				•	
Phormidium autumnale (C5)	•				
Phormidium persicinum	•				
Phormidium species (C18)				•	
Plectonema boryanum					
Pseudanabaena W 1173	•				•
Pseudanabaena catenata		•			
Tolypothrix tenuis		•			

Aus Tabelle 17 ist ersichtlich, daß bei den meisten der nicht adaptierenden Organismen die Verhältnisse der einzelnen Biliproteidkonzentrationen in Rot- und Grünlicht annähernd konstant sind. Eine Ausnahme macht Lyngbya C 35. Grünlicht bewirkt hier, gegenüber Rotlicht, eine deutlich erhöhte Syntheserate aller Biliproteide. Eine weitere Besonderheit besteht in der Feststellung, daß dieser nicht adaptierende Organismus sowohl im Rot-, als auch im Grünlicht deutlich mehr Phycocyanin als Phycoerythrin synthetisiert.

Bei Phormidium C 8 ist der Gehalt von Phycocyanin bzw. Allophycocyanin im Grünlicht, gegenüber Rotlicht, nur geringfügig erhöht. Da es bei dieser Alge nach Rot- und Grünlichteinstrahlung nur bei Phycoerythrin zu einer nennenswerten Schwankung kommt, könnte man dies bereits als Adaptationseffekt ansehen. Allerdings müßte es sich dann um eine Übergangsform zur Gruppe III (vgl. S. 89) handeln. Die dort aufgeführten Organismen synthetisieren jeweils im Grünlicht zehnmal mehr Phycoerythrin als Phycocyanin.

Nicht adaptierende Cyanobakterien fand TANDEAU DE MARSAC bei fast allen Ordnungen (Chroococcales, Pleurocapsales und Hormogonales). Unsere Untersuchungen beschränken sich bei diesem Adaptationstyp, mit Ausnahme von Dermocarpa violaceae, auf die Nostocales (Hormogonales) und zwar einheitlich auf die Familie der Oscillatoriaceae. Eine pleurocapsale, nicht adaptierende Dermocarpa ist auch bei TANDEAU DE MARSAC aufgeführt. Von sechs untersuchten Phormidium-Arten fand dieser Autor zwei nicht adaptierende Typen. Da jedoch nur Stamm-Nummern angegeben sind, ist ein näherer Vergleich mit den von uns gefundenen, nicht adaptierenden Phormidium-Arten nicht möglich. Nicht aufgeführt sind bei TANDEAU DE MARSAC eine Lyngbya und eine nicht adaptierende Pseudanabaena. Da unsere Pseudanabaena W 1173 nicht adaptiert, kann sie von der morphologisch gleichen Pseudanabaena catenata klar unterschieden werden. Auch ist die Pigmentausbeute unseres Organismus, im Vergleich mit Pseudanabaena catenata, bei beiden Lichtqualitäten deutlich höher.

Tabelle 18: Biliproteidgehalt von totaladaptierenden Cyanobakterien (Gruppe II).

Alge	Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge			Biliproteide mg/ml Rohextrakt aus 1,5 g Alge		
	Rotlicht			Grünlicht		
	PC	APC	PE	PC	APC	PE
<i>Anabaena variabilis</i>	0,90	0,30	(-0,03)*	1,10	0,63	0,93
<i>Calothrix parietina</i>	1,17	0,36	(-0,069)*	0,36	0,29	0,36
<i>Fremyella diplosiphon</i>	4,8!	1,62	(-0,041)*	0,93	1,05	2,19
<i>Pseudanabaena catenata</i>	1,10	0,25	(-0,032)*	0,58	0,26	0,66
<i>Tolypothrix tenuis</i>	1,10	0,21	(0,015)	0,20	0,08	0,35

*) Es ist kein Phycoerythrin vorhanden. Mit den von BENNETT und BOGORAD (1971) angegebenen Koeffizienten, die nicht für Phycoerythrin aus allen Algen gelten müssen, ergeben sich hier zum Teil negative Werte.

Die in obiger Tabelle aufgeführten Algen zählen zu den totaladaptierenden Organismen, da sie im Rotlicht kein Phycoerythrin mehr synthetisieren. Gleichzeitig nimmt der Gehalt an Phycocyanin bzw. Allophycocyanin, mit Ausnahme von Anabaena variabilis, stark zu. Bei Fremyella diplosiphon fand man, sogar im Rotlicht, eine um das Fünffache gesteigerte Phycocyaninsyntheserate. Die Einstellung der Phycoerythrinsynthese im Rotlicht wurde durch zwei analytische Methoden bestätigt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Tris-Glycin pH 8,8) der Rotlichtrohextrakte war in allen Fällen nur eine blaue Zone zu beobachten. Keiner der konzentrierten Rohextrakte ergab im Ouchterlonytest mit Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum ein Immunpräzipitat. Die Nachweisgrenzen von Phycoerythrin, in Form von noch sichtbaren Immunpräzipitaten, lagen im Ouchterlonytest für die entsprechenden Grünlichtrohextrakte (bezogen auf 25 µl) aus Fremyella diplosiphon bei $5,5 \times 10^{-4}$, aus Tolypothrix tenuis bei $2,2 \times 10^{-4}$, aus Anabaena variabilis bei $3,8 \times 10^{-4}$ und aus Pseudanabaena catenata bei $4,1 \times 10^{-4}$, aus Calothrix parietina bei $2,3 \times 10^{-4}$.

Tabelle 19: Biliproteidgehalt von teiladaptierenden Cyanobakterien (Gruppe III).

Alge	Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge			Biliproteide mg/ml Rohextrakt aus 1,5 g Alge		
	Rotlicht			Grünlicht		
	PC	APC	PE	PC	APC	PE
<i>Aphanocapsa</i> 6701	2,10	0,85	0,196	2,20	0,93	2,62
<i>Nostoc muscorum</i> A	0,50	0,13	0,026	0,54	0,25	0,30

Bei dieser Gruppe, vertreten durch zwei Species, ist im Rotlicht die Synthese von Phycoerythrin stark vermindert, Phycoerythrin wird aber noch gebildet. Auch hier wurden die Rotlichtrohextrakte zum Nachweis von Phycoerythrin elektrophoretisch aufgetrennt. Während bei *Aphanocapsa* 6701 das noch vorhandene Phycoerythrin in der blauen Zone lief, bekam man bei *Nostoc muscorum* A eine klare Aufspaltung von Phycoerythrin und Phycocyanin.

Tabelle 20: Biliproteidgehalt von Cyanobakterien mit besonders wenig Phycoerythrin (Gruppe IV) oder Phycoerythrocyanin.

Alge	Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge			Biliproteide mg/ml Rohextrakt aus 1,5 g Alge		
	Rotlicht			Grünlicht		
	PC	APC	PE	PC	APC	PEC*
<i>Phormidium ambiguum</i> (C7)	1,44	0,72	(0,018)	1,14	0,30	0,45
<i>Phormidium species</i> (C18)	1,40	0,45	(0,062)	0,78	0,27	0,21

*) PEC = Phycoerythrocyanin

570 nm bzw. 580 nm sind für Phycoerythrin ungewöhnliche Wellenlängen. Im Falle von *Phormidium ambiguum*, Abbildung 39, könnte es sich um ein im Grünlicht gebildetes Pigment handeln, das von

BRYANT et al. (17) als Phycoerythrocyanin bezeichnet in einer Anabaena species gefunden wurde. Ein Hinweis ist die Beobachtung, daß der konzentrierte Grünlichtrohextrakt von Phormidium ambiguum im Ouchterlonytest mit Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum kein Immunpräzipitat erkennen ließ. Nach BRYANT et al. ergibt das Antiphycoerythrocyanin Antiserum mit C-Phycoerythrin keine Kreuzreaktion. Wie aus Tabelle 20 ersichtlich, synthetisieren beide Cyanobakterien im Grünlicht relativ wenig dieser Pigmente. Auch hier erhöhte sich im Rotlicht der Phycocyanin- und Allophycocyaninegehalt.

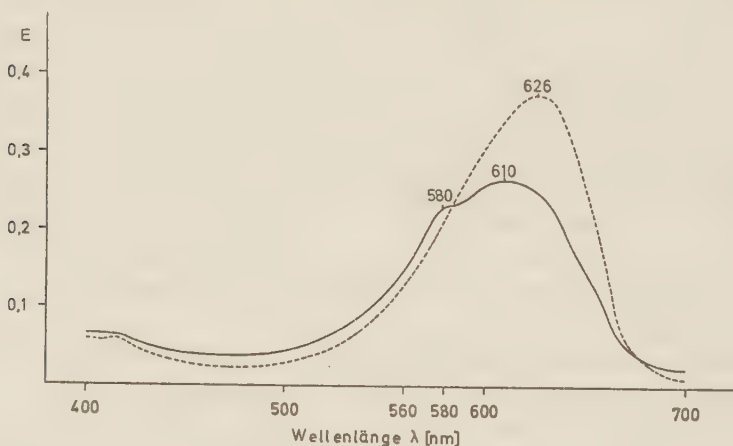


Abb. 39: Absorptionsspektren der 1 : 10 verdünnten Rohextrakte von Phormidium ambiguum nach Rot- und Grünlichteinstrahlung; aufgenommen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 .
— Grünlichtrohextrakt; -- Rotlichtrohextrakt.

Die in Tabelle 21 aufgeführten nur Phycocyanin synthetisierenden Cyanobakterien lassen keinen Adaptationseffekt erwarten. Trotzdem konnte hier jedoch in allen Fällen bei den von uns untersuchten Species gezeigt werden, daß die Rotlichteinstrahlung offensichtlich eine Erhöhung der Biliproteidkonzentrationen bewirkte.

Tabelle 21: Biliproteidgehalt von nur Phycocyanin synthetisierenden Cyanobakterien (Gruppe V).

Alge	Biliproteide mg/ml aus 1,5 g Alge		Biliproteide mg/ml Rohextrakt aus 1,5 g Alge	
	Rotlicht		Grünlicht	
Anacystis nidulans	3,20	0,70 (-0,15)*	2,70	0,68 (-0,15)*
Oscillatoria rubescens	1,90	0,60 (0,066)	1,00	0,30 (0,072)
Plectonema boryanum	2,86	1,18 (-0,16)*	1,62	0,65 (-0,11)*

*) siehe Fußnote Tabelle 18.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es zu erfahren, inwieweit die Adaptation innerhalb von Phycoerythrin und Phycocyanin synthetisierenden Cyanobakterien verbreitet ist. Derartige Untersuchungen waren in der Literatur noch nicht beschrieben. Erst kurz vor Abschluß dieser Arbeit veröffentlichte TANDEAU DE MARSAC (113) Adaptationsuntersuchungen an 44 Algenstämmen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen ergaben, daß die chromatische Adaptation oder Adaptationseffekte bei Cyanobakterien offensichtlich nicht so selten sind, wie früher angenommen. Immerhin konnte mit den von uns gewählten Bedingungen von vierzehn Phycoerythrin und Phycocyanin synthetisierenden Species bei neun ein klarer Adaptationseffekt gefunden werden. Neu ist die Entdeckung, daß es zwischen adaptierenden und nicht adaptierenden Cyanobakterien eine Zwischenform gibt, die bei Rotlichteinstrahlung die Phycoerythrinsynthese zwar vermindert, aber nicht völlig einstellt.

Bestätigt wurde die von BORESCH (15) gemachte Beobachtung, daß nicht alle Phycoerythrin und Phycocyanin synthetisierenden Species adaptieren. In diesem Fall (Gruppe I) scheint der Gehalt an Biliproteiden sowohl im Rot-, als auch im Grünlicht konstant zu sein. Vorherrschend ist hier bei beiden Lichtqualitäten ein erhöhter Gehalt an Phycoerythrin zu beobachten. Eine Ausnahme fand man bei der Lyngbya (C 39). Hier war die Biliproteidaus-

beute im Grünlicht deutlich erhöht. Trotzdem handelt es sich hierbei nicht um einen Adaptationseffekt. Definitionsgemäß adaptiert ein Organismus nur dann, wenn Phycoerythrin oder Phycocyanin selektiv im Rot- oder Grünlicht erhöht bzw. vermindert ist. Daß diese nicht adaptierende Species sowohl im Rot- als auch im Grünlicht mehr Phycocyanin synthetisiert, dürfte als Seltenheit betrachtet werden.

Innerhalb der adaptierenden Cyanobakterien haben wir drei physiologische Gruppen unterschieden. Alle Cyanobakterien der Gruppe II zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Rotlicht kein Phycoerythrin mehr synthetisieren und gleichzeitig der Phycocyanin- und Allophycocyaningehalt ansteigt. Charakteristisch für Gruppe III sind die relativ konstanten Phycocyaninsyntheseraten sowohl bei Rot- als auch bei Grünlichteinstrahlung. Bei dieser Gruppe vermindert sich im Rotlicht nur der Phycoerythringehalt. Die in Gruppe IV aufgeführten Cyanobakterien könnten im Prinzip auch zur Gruppe II gezählt werden. Da sie aber im Grünlicht sehr wenig Phycoerythrin bzw. Phycoerythrocyanin synthetisieren, wurden sie getrennt aufgeführt. Bei diesen Species erhebt sich die Frage, ob sie bei natürlich vorkommenden Standorten überhaupt noch Phycoerythrin bilden. Denn offensichtlich läßt erst die Erhöhung des Grünlichtanteils bei beiden Organismen eine kleine Menge Phycoerythrin erkennen.

Ob man bei allen nur Phycocyanin und Allophycocyanin synthetisierenden Species durch Rotlichteinstrahlung eine erhöhte Ausbeute dieser Biliproteide bewirkt, kann nicht gesagt werden, da die Anzahl der in Tabelle 16 untersuchten Algen für eine generelle Aussage nicht ausreicht. Aus den Tabellen 18, 20 und 21 ist zu ersehen, daß mit der Phycocyaninzunahme auch der Gehalt an Allophycocyanin ansteigt. Da die Bestimmung beider Pigmente jedoch aus dem Rohextrakt erfolgte, kann man nicht schließen, ob der Syntheseweg koordiniert erfolgt.

Aufgrund sehr ähnlicher Untersuchungsmethoden sind die Ergebnisse von TANDEAU DE MARSAC mit unseren durchaus vergleichbar. In beiden Fällen wurden die Biliproteidkonzentrationen nach

den Formeln von BENNETT und BOGORAD (6) bestimmt, wobei TANDEAU DE MARSAC lediglich den Extinktionskoeffizienten für Phycoerythrin von 9,62 auf 12,5 abänderte. Die von ihm eingestrahltten Lichtenergien bei der Aufzucht der Organismen liegen, im Vergleich mit unseren Werten, um eine Zehnerpotenz niedriger.

So sind seine Untersuchungen an noch mehr Algen eine Ergänzung über die Verbreitung der chromatischen Adaptation innerhalb der Cyanophyceensystematik. Während sich unsere Stämme mit Ausnahme von Dermocarpa violaceae und Aphanocapsa 6701 auf die Hormogonales beschränken, untersuchte TANDEAU DE MARSAC weitere Organismen aus den Ordnungen der Chroococcales, Chamaesiphonales und Pleurocapsales. Insbesondere bei den Pleurocapsales fand er eine beträchtliche Anzahl adaptierender Organismen. Übereinstimmend mit seinen Ergebnissen ist unsere Feststellung, daß es zwischen nicht adaptierenden und adaptierenden Arten eine Zwischenform gibt, die sowohl bei einzelligen als auch bei fadenförmigen Algen vorkommt. Dieser Adaptationstyp, den wir speziell für Aphanocapsa 6701 und eine Nostoc-Art bestätigen konnten, zeichnete sich nur durch eine verminderte Phycoerythrinsynthese aus. Weiterhin fand man übereinstimmend, daß sich innerhalb der Arten eine Adaptationsvariationsbreite ergibt. Dies gilt besonders für Phormidium-Arten, bei denen von uns bis zu vier Typen unterschieden werden konnten.

7. Elektronenmikroskopie

Wie aus den Adaptationsuntersuchungen auf Seite 88 (Gruppe II) hervorging, erhöhte sich bei den meisten Cyanobakterien der Gesamtbiliproteidgehalt nach Rotlichteinstrahlung. Diese Beobachtung veranlaßte uns zu einer elektronenmikroskopischen Phycobilisomenbetrachtung dieser in Rot- und Grünlicht gewachsenen Cyanobakterien. Ausgewählt wurden hierfür die totaladaptierenden Species Fremyella diplosiphon, Tolypothrix tenuis und Pseudanabaena catenata. Entsprechend den auf Seite 14 angegebenen Wachstumszeiten, wurden diese Algen nach vorangegangener Inkubation mit Glutaraldehyd (21) geerntet und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

Die Phycobilisomen sind Multiproteinkomplexe, die sich aus Allophycocyanin, Phycocyanin und bisweilen Phycoerythrin zusammensetzen. Im Gegensatz zu den Eukaryonten, wo die Thylakoide in membranbegrenzten Zellkompartimenten (Chromatophoren) eingeschlossen sind, liegen sie bei den Prokaryonten (Bakterien und Blaualgen) im Cytoplasma.

So fanden wir zunächst einen grundsätzlichen Unterschied, unabhängig von Rot- und Grünlichteinstrahlung, in Form und Anordnung der Thylakoidmembranen. So waren für Pseudanabaena catenata und Pseudanabaena W 1173 Thylakoidmembranen charakteristisch, die sowohl in runden, als auch in langgestreckten Zellen, parallel zur Zellwand verliefen (4 - 6 Reihen); vergleiche Abbildung 40/41. Bei einer Vergrößerung von 40 000 konnten bei diesen Algen keine Phycobilisomen auf den Thylakoidmembranen identifiziert werden.

Kennzeichnend für Fremyella diplosiphon und Tolypothrix tenuis sind unregelmäßig geschwungene Thylakoide im Cytoplasma. Bei diesen Algen war eine Identifizierung der Phycobilisomen auf den Thylakoiden möglich. Ein Ausmessen der Phycobilisomen jedoch nicht, da die zu unterschiedliche Kontrastierung den genauen Verlauf der Proteinkomplexe nicht erkennen ließ. Ein erkennbarer Unterschied der bei Rot- und Grünlicht gewachsenen Zellen von

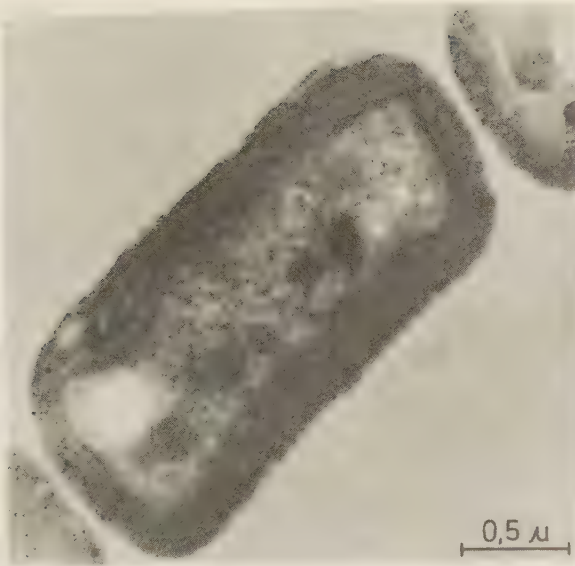


Abb. 40: *Pseudanabaena catenata* Grünlicht (40 000 x); Glutaraldehyd-Fixierung.

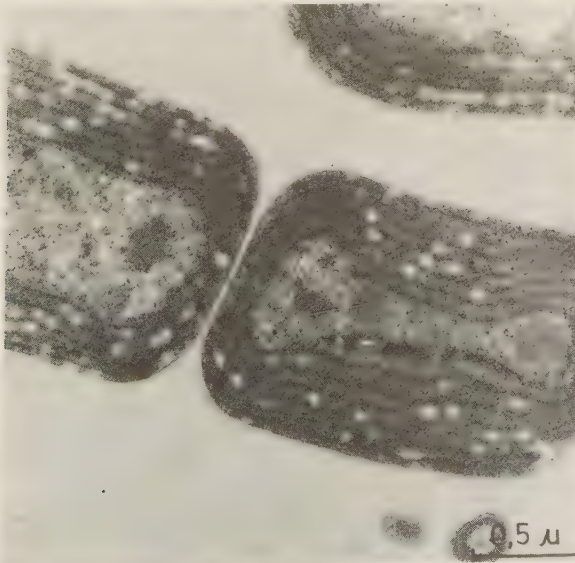


Abb. 41: *Pseudanabaena* W 1173 Grünlicht (40 000 x); Glutaraldehyd-Fixierung.

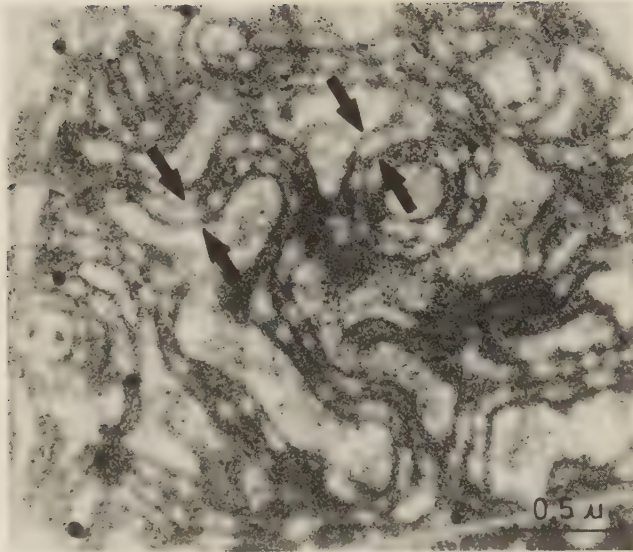


Abb. 42: *Fremyella diplosiphon* - Grünlicht (40 000 x); Glutaraldehyd- OsO_4 Fixierung. Nachkontrastiert; Uranylacetat-Bleicitrat.

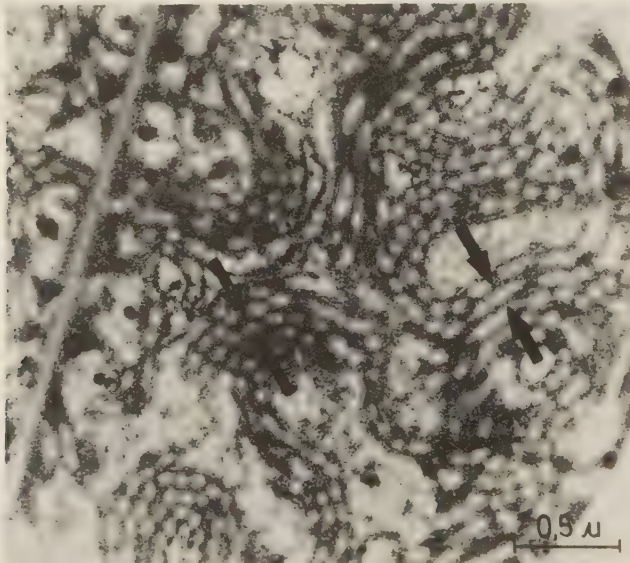


Abb. 43: *Fremyella diplosiphon* - Rotlicht (40 000 x); Glutaraldehyd- OsO_4 Fixierung. Nachkontrastiert; Uranylacetat-Bleicitrat.

Fremyella diplosiphon bestand in den Abständen der Thylakoide zueinander. Die Thylakoidabstände der im Grünlicht gewachsenen Fremyella diplosiphon betrugen ungefähr $0,1 \mu$ (Abb. 42). Im Rotlicht dagegen waren sie durchweg kleiner (ca. $0,05 \mu$); vergleiche Abbildung 43. Ansätze zu Phycobilisomen waren jedoch auf Rotlichtthylakoiden, im Vergleich mit Grünlicht, häufiger zu finden. Im Grünlicht schien die Basis der Phycobilisomen breiter auf den Thylakoiden aufzusitzen.

Bei Rot- und Grünlicht gewachsenen Tolypothrix tenuis Zellen scheinen die Thylakoide einen gleichen Anstand zueinander zu haben. Auffallend waren bei dieser Alge, daß im Grünlicht sehr oft mehrere Thylakoide dicht zusammenlagen (Abb. 44).

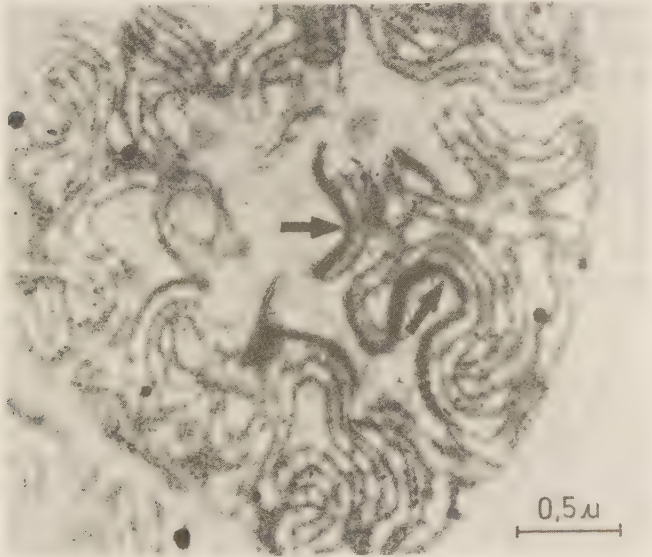


Abb. 44: Tolypothrix tenuis - Grünlicht ($40\ 000 \times$); Glutaraldehyd- OsO_4 Fixierung.

Wie oben aufgeführt, liegen die Thylakoide von Fremyella diplosiphon und Tolypothrix tenuis unregelmäßig gebunden im Cytoplasma, im Gegensatz zu Pseudanabaena catenata und Pseudanabaena W 1173, bei denen sie parallel zur Zellwand verlaufen. Letz-

tere Anordnung fand man hauptsächlich, mit Ausnahme einiger Oscillatoria-Arten, bei den chroococcalen Algen, wie z.B. Anacystis nidulans (107), Synechococcus plancticus (31), Synechococcus lividus (34). Diese Thylakoidanordnungen können aber auch durch äußere Einflüsse verändert werden. So konnte ALLEN (2) bei Anacystis nidulans zeigen, daß die Lichtintensität bei der Aufzucht dieser Alge sowohl den Thylakoidgehalt als auch die Pigmentkonzentration beeinflusst. Ähnliches fanden FINDLEY et al. (37) bei Chlorogloea fritschii. Diese Alge wies insbesondere bei der Aufzucht in niedriger Lichtintensität langgestreckte, dicht zusammengepackte Thylakoidmembranen im Cytoplasma auf. Bei hoher Lichtintensität waren die Thylakoide fragmentiert. Ebenso hat die Temperatur einen Einfluß auf die Feinstruktur von Algenzellen. So fand VENKATARAMAN (116) einen Unterschied zwischen bei 26° C und 32° C gewachsenen Anacystis nidulans Zellen. Im ersten Fall beobachtete dieser Autor eine Anhäufung der Photosyntheseprodukte, wodurch die Thylakoide verdeckt wurden.

Einen Temperatureffekt beobachteten wir bei Tolypothrix tenuis. Sowohl im Rot- als auch im Grünlicht hatten wir gesehen, daß bei dieser Alge die Thylakoidmembran unregelmäßig geschwungen das Cytoplasma ausfüllt. Tolypothrix tenuis Zellen, die bei 4° C gehalten und mit 1 000 Lux bestrahlt wurden, zeigten Thylakoidmembrane, die sich an den Zellwänden anlagerten (Abb. 45).

Die sonst üblichen Windungen waren nicht mehr zu finden. Makroskopisch zeichneten sich derartige Zellen durch eine gelborange Verfärbung aus, die nach Rückversetzen in höhere Temperatur (18° C - 20° C) die normal schmutzig-grüne Farbe wieder annahm. Auf diesen langgestreckten Thylakoidmembranen konnten keine Phycobilisomen mehr gefunden werden.

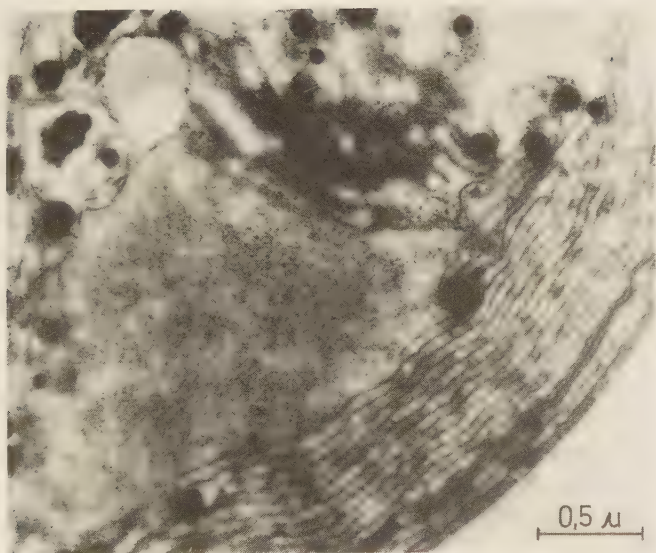


Abb. 45: *Tolypothrix tenuis* bei 4° C gewachsen (40 000 x);
Glutaraldehyd-OsO₄ Fixierung.

Fremyella diplosiphon zeigt, wie BENNETT und BOGORAD (6) feststellten, nach Fluoreszenz- bzw. Rotlichteinstrahlung sowohl bei den Trichomen als auch bei den Einzelzellen morphologische Unterschiede. So sind die Trichome im Rotlicht zehnmal kürzer als diejenigen von Fluoreszenzlichtkulturen. Die Einzelzellen in Rotlichttrichomen sind abgerundet, während sie im Fluoreszenzlicht zylindrisch langgestreckt sind. Offensichtlich wirken sich diese spezifischen Veränderungen auch auf die Feinstruktur der Zellen aus. Ein Hinweis darauf sind die von uns gefundenen Thylakoidabstände, die im Rotlicht gegenüber Grünlicht deutlich kleiner sind. Hier dürfte insbesondere das kleinere Zellvolumen eine Verdichtung der Thylakoidmembrane bewirken.

Die parallel verlaufenden Thylakoide bei Pseudanabaena W 1173 und Pseudanabaena catenata können als Hinweis gelten, daß diese Anordnung für die Gattung Pseudanabaena typisch ist, obwohl Thylakoidanordnungen keine taxonomische Aussage zulassen. Wie auf Seite 98 aufgeführt und auch von uns bei Tolypothrix tenuis festgestellt, sind Thylakoidmembrane auch von äußeren Einflüssen abhängig.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Aus dem Gewächshaus des Botanischen Gartens München wurde eine Phycoerythrin synthetisierende Blaualge isoliert, die aufgrund der Morphologie als *Pseudanabaena* erkannt wurde. Sie erhielt die Stamm-Nummer W 1173.
2. Für die Gewinnung der Biliproteide wurden verschiedene Zellaufschlußmethoden untersucht. Beschrieben wird ein Verfahren, das die Proteolyse von Biliproteiden weitgehend vermeidet.
3. C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus *Pseudanabaena* W 1173 wurden mit den entsprechenden Biliproteiden aus anderen Cyanobakterien verglichen. Dazu wurden *Anacystis nidulans*, *Aphanocapsa* 6701, *Dermocarpa violaceae*, *Fremyella diplosiphon*, *Lyngbya* C 39, *Nostoc muscorum* A, *Phormidium autumnale*, *Phormidium persicinum*, *Plectonema boryanum*, *Pseudanabaena catenata*, *Tolypothrix tenuis* kultiviert und ihre Biliproteide gewonnen.

Bei der Elektrophorese ließen sich die untersuchten Algen in folgende Gruppen einteilen:

- a) M_B Phycoerythrin 0,34-0,38: *Fremyella diplosiphon*
Nostoc muscorum A
Pseudanabaena catenata
Pseudanabaena W 1173
Tolypothrix tenuis
 - b) M_B Phycoerythrin 0,41-0,46: *Lyngbya* C 39
Phormidium autumnale C5
 - c) M_B Phycoerythrin 0,48: *Dermocarpa violaceae*
Phormidium persicinum
- Mobilität Phycocyanin < Phycoerythrin
- d) M_B Phycoerythrin 0,35-0,40: *Aphanocapsa* 6701
Calothrix membranaceae

Breite Phycoerythrinzone; Phycocyanin liegt dazwischen. Bei der isoelektrischen Fokussierung ergab sich durchweg eine Aufspaltung in zwei Phycoerythrin- und Phycocyaninzone. Die pI-Werte lagen für Phycoerythrin bei 4,75-5,40; für Phycocyanin bei 5,00-5,37. Höhere pI-Werte wurden bei Proteolyseprodukten gefunden.

4. Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurden die Molekulargewichte der Untereinheiten verschiedener Phycoerythrine und Phycocyanine bestimmt (Tabelle 5, S. 38; Tabellen 8 und 9, S. 47). Aufgrund der Gelchromatographie liegt das Phycoerythrin von *Pseudanabaena* W 1173 im Rohextrakt nebeneinander als Monomer (α, β), Dimer (α, β)₂ und Oktomer (α, β)₈ vor. Durch Densitometrie ergab sich ein Chromophorverhältnis der *Pseudanabaena* W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten von $\alpha : \beta = 1 : 1,45$, bei einem Proteinverhältnis von $1 : 0,98$ (Coomassie-Blauanfärbung) bzw. $1 : 1,1$ (LOWRY).
5. Das bei der Extraktion der Algenzellen häufig auftretende zweigipflige Phycoerythrin (λ_{max} 540 nm und 560 nm) wurde als Proteolyseprodukt erkannt. Proteasen der Algenzellen bauen α - und β -Kette, Trypsin vorwiegend die α -Kette ab.
6. Das Phycoerythrin aus *Phormidium autumnale* besitzt als einziges der untersuchten Phycoerythrine zwei Maxima (552 nm und 570 nm Rohextrakt). Beide Untereinheiten (α 16 000; β 19 000) sind um ca. 3 000 Dalton kleiner als die der anderen Phycoerythrine.
7. Mit Hilfe eines Kaninchenantiserums gegen elektrophoretisch gereinigtes Phycoerythrin aus *Pseudanabaena* W 1173 wurde die immunologische Kreuzreaktion von verschiedenen Cyanobakterien untersucht. Die Ergebnisse der Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY lassen darauf schließen, daß neben gemeinsamen Determinanten für alle Phycoerythrine artspezifische Determinanten vorkommen. Das partiell abgebaute Phycoerythrin hat einen Teil der gemeinsamen Phycoerythrindeterminanten verloren.
8. Mit einem speziell entwickelten Phagentest wurden die Phycoerythrine verschiedener Cyanobakterien verglichen. An T_4 -Bakteriophagen wurde das elektrophoretisch isolierte *Pseudanabaena* Phycoerythrin gekoppelt. Die immunspezifische Inaktivierung des Phycoerythrin Bakteriophagen-Konjugats mit dem Antiserum kann durch freies Phycoerythrin gehemmt werden. Je

strukturähnlicher die Phycoerythrine sind, desto größer ist die Hemmung der Inaktivierung. Aufgrund der Hemmkapazität der einzelnen Phycoerythrine ließ sich eine immunologische Reihenfolge aufstellen (vgl. Tabellen 14 und 15, S. 72). Bei der quantitativen Präzipitationsreaktion heterologer Phycoerythrine ergab sich eine andere Reihenfolge (Abb. 37, S. 79).

9. Untersucht wurde die chromatische Adaptation mit Grün- und Rotlicht an verschiedenen Cyanobakterien (Grünlicht 5 500 erg/cm²/sec.; Rotlicht 5 000 erg/cm²/sec.). Die Bestimmung der Biliproteide ergab fünf Gruppen von Cyanobakterien:
 - a) nicht adaptierende
 - b) totaladaptierende (kein PE im Rotlicht)
 - c) teiladaptierende (Phycoerythrin im Rotlicht vermindert)
 - d) Phycoerythrocyanin haltige
 - e) Phycocyanin und Allophycocyanin adaptierende (vgl. Tabelle 16, S. 86).
10. Durch Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß die Thylakoidmembranen bei *Pseudanabaena catenata* und *Pseudanabaena W 1173* parallel zur Zellwand angeordnet sind, während sie bei *Fremyella diplosiphon* und *Tolypothrix tenuis* die übliche Anordnung bei Hormogonien aufweisen (schleifenförmiges Ausfüllen des Cytoplasmas). Beim Wachstum bei 4⁰ C sind die Thylakoide auch bei *Tolypothrix tenuis* parallel angeordnet. Bei *Fremyella diplosiphon* betragen die Thylakoidabstände im Grünlicht 0,1 μ , im Rotlicht 0,05 μ .

9. Experimenteller Teil

9.1. Isolierung einer C-Phycoerythrin synthetisierenden Alge (Pseudanabaena W 1173)

Die mittels einer Impföse aus dem Wasserpflanzenbeet entnommenen schleimigen Algenklumpen wurden von anhaftender Erde befreit und in 50 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mehrmals gewaschen. Der Waschvorgang wurde so lange fortgesetzt, bis der Überstand nach niedertouriger Zentrifugation nicht mehr braun gefärbt war. Die noch zusammenhaften Algenflächen wurden mittels eines Skalpells auf $0,5 \text{ cm}^2$ große Stücke gebracht, in je 50 ml verschiedener Nährlösungen aufgenommen und in 100 ml fassende Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Aufzucht der Flüssigkulturen entsprach den auf Seite 111 beschriebenen Bedingungen. Hierbei erwiesen sich citrathaltige Nährlösungen als unbrauchbar, da sich bei dieser Kohlenstoffquelle vorhandene Bakterien innerhalb von zwölf Stunden so schnell vermehrten, daß das Algenwachstum stark gehemmt wurde. (erkennbar an der starken Trübung des Nährmediums). Das geeignetste Medium entsprach der Zusammensetzung "C" nach KRATZ und MYERS (69) ohne Citrat (vgl. S. 107). Innerhalb von 24 Stunden schwammen braune zusammenhängende Trichome auf der Mediumoberfläche. Diese Zellfäden wurden sofort auf frisches Medium übertragen und dieser Rhythmus genau 14 Tage beibehalten. Die nun abgeimpften Trichome wurden auf 1 % Nähragarplastikschalen ($\varnothing$ 9 cm) überimpft und in einem in nördlicher Richtung liegenden Zimmer im Tag-Nachtrhythmus wachsen lassen. Von braun gefärbten stark kriechenden Trichomen wurden nach vier Tagen die Enden auf frische Platten übertragen. Hierbei wurde insbesondere eine erhebliche Verminderung anhaftender Bakterien erzielt. Nach genau zwei Monaten ständigen Überimpfens hatten wir eine Species isoliert, die absolut frei von anderen Algen war und die bakterielle Verunreinigung auf ein Maß herabgesetzt, daß sie sich gut kultivieren ließ (einzelne Reinigungsschritte wurden mikroskopisch verfolgt).

9.2. Aufzucht und Aufschluß verschiedener Blaualgenstämme

9.2.1. Herkunft der verwendeten Blaualgen

1. Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen bezogen wir folgende Blaualgen:

<i>Anacystis nidulans</i>	L 1402-1
<i>Calothrix membranaceae</i>	B 1410-1
<i>Calothrix parietina</i>	B 1410-1
<i>Nostoc muscorum</i> A	B 1453-12b
<i>Pseudanabaena catenata</i>	B 1464-1
<i>Tolypothrix tenuis</i>	

2. Herr Professor CHAPMAN vom Department of Biology Los Angeles, Kalifornien, stellt uns folgende Algen zur Verfügung:

<i>Dermocarpa violaceae</i>	1635
<i>Fremyella diplosiphon</i>	
<i>Oscillatoria rubescens</i>	
<i>Phormidium persicinum</i>	
<i>Plectonema boryanum</i>	581

3. Folgende Stämme erhielten wir von Herrn Professor NULTSCH, Lehrstuhl für Botanik der Universität Marburg/Lahn:

<i>Anabaena variabilis</i> (C12)
<i>Lyngbya species</i> (C39)
<i>Phormidium ambiguum</i> (C7)
<i>Phormidium autumnale</i> (C5)
<i>Phormidium species</i> (C8)
<i>Phormidium species</i> (C18)

4. Eine *Aphanocapsa* (6701) wurde uns von Herrn Professor STANIER, Pasteur-Institut Paris, geschickt.

5. Die *Pseudanabaena* W 1173 isolierten wir aus einem Gewächshausbeet des Botanischen Gartens in München (Entnahmedatum von schleimigen Algenmassen: 27.11.1973), vgl. Seite 8.

6. Vom Institut für Algenforschung und Technologie Dortmund stellte uns Herr Prof. SOEDER 250 g einer *Spirulina species* zur Ver-

fügung.

9.2.2. Für die Aufzucht der genannten Algen wurden folgende Medien verwendet

Medium A : für *Fremyella diplosiphon*, *Nostoc muscorum* A und *Plectonema boryanum*

Zusammensetzung:

I	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250 mg
	NaCl	230 mg
	KNO ₃	2,0 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mg
II	K ₂ HPO ₄	350 mg
III	Spurenelemente	1 ml
IV	Fe/EDTA-Lösung	2 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Zusammensetzung der Spurenelemente (ARNON):

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
H ₃ BO ₃	2,9 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	40 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	80 mg
(NH ₄) ₂ MoO ₄	177 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Zusammensetzung der Fe/EDTA-Lösung:

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	4,0 g
NaEDTA	50,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Medium BI₁ : für *Anacystis nidulans*, *Aphanocapsa* 6701, *Calothrix* membranaceae, *Calothrix parietina*, *Pseudanabaena catenata*, *Pseudanabaena* W 1173, *Tolypothrix tenuis*

Zusammensetzung:

I	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250 mg
	Ca(NO ₃) ₂	25 mg
	KNO ₃	1,0 g
	Fe(SO ₄) ₃	2 mg
II	K ₂ HPO ₄	1,0 g
III	Spurenelemente	1 ml
IV	Fe/EDTA-Lösung	1 ml
	Aqua dest.	1000 ml

Zusammensetzung der Spurenelemente:

	ZnCl ₂	40 mg
	H ₃ BO ₃	600 mg
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	15 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	40 mg
	MnCl ₂ x 2 H ₂ O	40 mg
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	370 mg
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Zusammensetzung der Fe/EDTA-Lösung:

	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	2,4 g
	Na ₂ EDTA	18,6 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

Medium C : für *Anabaena variabilis* (C12), *Lyngbya species* (C39)
Phormidium ambiguum (C7), *Phormidium autumnale* (C5),
Phormidium species (C8), *Phormidium species* (C18)

Zusammensetzung:

I	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200	mg
	KNO ₃	800	mg
	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	200	mg
II	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	200	mg
III	1% Ammoniumeisen- citratlösung	0,6	ml
	Aqua dest.	ad 1000	ml

Dieses Medium entspricht einer von DREWS (30) modifizierten Nährlösung von PIEPER.

Medium D : für *Dermocarpa violaceae* und *Phormidium persicinum*
(Seewassermedium)

Zusammensetzung:

I*	NaCl	18,0	g
	KCl	600	mg
	NaNO ₃	500	mg
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5,0	g
	Tris	1,0	g
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,5	mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	277	mg
II	Spurenelemente	30	ml
III	K ₂ HPO ₄	300	mg
IV	Aneurin-HCl	1	mg
	Aqua dest.	1000	ml

*) Die Salzlösung I wird mit 1 N HCl auf pH 7,4 - 7,6 eingestellt.

Zusammensetzung der Spurenelemente:

Na_4EDTA	1.0	g
ZnCl_2	14	mg
H_3BO_3	1,14	g
CoCl_2	4	mg
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	48	mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	144	mg
Aqua dest.	ad 1000	ml

Medium Z : für *Oscillatoria rubescens*

Zusammensetzung:

I	NaNO_3	600	mg
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	60	mg
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	25	mg
II	K_2HPO_4	30	mg
III	Eisenlösung	10	ml
IV	ARNON Spurenelemente	0,2	ml

Zusammensetzung der Eisenlösung:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	300	mg
1 N HCl	1	ml
Na_2EDTA	700	mg
Aqua dest.	ad 1000	ml

9.3. Sterilisationsverfahren

Das Freimachen von Keimen erfolgte durch drei Methoden:

1. Dampfsterilisation

Die Dampfsterilisation wird im Autoklaven mindestens 20 Minuten bei einem atü,entsprechend gespanntem Wasserdampf von 120° C, durchgeführt (Autoklav der Firma DEUTSCH & NEUMANN, 110 l). Mit diesem Verfahren wurden alle Nährlösungen, Erlenmeyerkolben und Reagenzgläser mit Kapsenbergkappen sterilisiert. 250-300 ml fassende Erlenmeyer-Enghalskolben, die mit einem Stopfen aus Verbandmull verschlossen und mit Alufolie abgedeckt waren, wurden nach dem Autoklavieren vorrätig gehalten. Die in römischen Zahlen angegebenen Bestandteile der Medien wurden getrennt sterilisiert und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur zusammengegeben.

2. Heißluftsterilisation

Dieser Vorgang wurde in einem Trockenschrank (MEMMERT TV 80 UL) insbesondere für die Algenzuchtflaschen der Größe $\varnothing$ 8 cm x 80 cm durchgeführt. Desgleichen wurden so die dazugehörenden Gummistopfen mit den darin eingelassenen Be- und Entlüftungsrohren behandelt. Sterilisationsdauer 10 Stunden bei 100° C.

3. Keimfreimachen durch Alkohol

Diese Methode fand ausschließlich für 80 l fassende PVC-Tonnen Anwendung. Die Behälter wurden, nach sorgfältiger Reinigung mit einem Spülmittel und mehrmaligen Auswaschen mit Wasser, mittels eines mit absolutem Alkohol getränkten Wattebauschs ausgerieben.

9.4. Überimpfmethoden

Bei allen Impfvorgängen wurde darauf geachtet, daß die, zum Teil natürlich bedingten, bakteriellen Verunreinigungen der Algen nicht zunahmen. Überimpft wurden einerseits Stammkulturen auf Flüssigmedien, andererseits auf Agarplatten oder Agarröhrchen, um die Art zu erhalten. Dies geschah mit Hilfe eines Chrom-

Nickeldrahtes, der am vorderen Ende eine Öse enthielt und in einem Kollehalter befestigt war. Vor jeder Algenentnahme aus einer Stammkultur wurde der Draht ausgeglüht, im Agar oder Flüssigmedium abgekühlt, mit Zellen beladen und so die Alge neu übertragen. Die mit frischem Medium vorbereiteten Kolben wurden am Rand abgeflammt und die mit Algenzellen beladene Impfnadel schräg eingeführt. Durch kreisende Bewegungen im Medium entfernten sich die Algenzellen von der Impfnadel und darauf wurde der Kolben wieder verschlossen. Beim Überimpfen der Kolben auf Flaschen wurden die Ränder und Gefäße kurzzeitig abgeflammt.

9.5. Algenaufzucht

9.5.1. Stammkulturen

Alle verwendeten Blaualgenstammkulturen wurden entweder in flüssigem Nährmedium oder auf einem 1 % Agarnährboden bei Zimmertemperatur im Tag-Nachtrhythmus aufbewahrt. Alle Phormidiumspecies, Dermocarpa violaceae und Anabaena variabilis mußten zur Erhaltung der Art in flüssigem Medium aufbewahrt werden. Hierzu dienten dickwandige Reagenzgläser (Größe 1,6 x 16 cm), die mit Kapsenbergkappen verschlossen wurden. In jedes dieser Reagenzgläser wurden ca. 6 ml des entsprechenden Mediums eingefüllt und mit der Alge in einem schräg gebauten PVC-Gestell aufbewahrt. In Abständen von zwei bis drei Monaten wurden die Stammkulturen frisch überimpft. Alle anderen Algen wurden zur Erhaltung entweder auf Agarplatten oder in Agarröhrchen kultiviert.

9.5.2. Kolbenkulturen

Flüssigkulturen wurden meist in 200-300 ml fassenden Erlenmeyerkolben bei 18°-20° C wachsen lassen. Zum Ausprobieren geeigneter Medien für bestimmte Algen verwendeten wir 50 ml Enghalskolben. In der Regel wurden alle Kolben höchstens halb mit Medium gefüllt. Nach dem Animpfen kamen sie auf eine, von der Werkstatt des Botanischen Instituts gebaute, Schüttelapparatur. Diese bestand

im wesentlichen aus einem Eisengerüst (110 x 62 cm), in das eine Preßspanplatte eingelassen war. Die Platte enthielt Öffnungen in die die Kolben hineingestellt wurden. Durch ein Getriebe wurde das Ganze von einem Elektromotor in seitliche Schwingungen versetzt. Über der Apparatur hing im Abstand von 50 cm ein Lampenaggregat mit zwei 40 Watt starken Neonröhren, die eine Lichtintensität von 800 - 1000 Lux abstrahlten. Bei diesen Bedingungen ließ man die Algen drei bis vier Wochen unter Dauerlicht wachsen.

9.5.3. Flaschenkulturen

Danach wurde der Inhalt der Kolben auf Flaschen überimpft und in das Algenzuchtbecken (67) gestellt. Die im Becken herrschende Temperatur schwankte von 18° bis 22° C. Mittels einer schwarzen PVC-Wand wurde das Becken in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Als Lichtquelle dienten hier auf der einen Seite hellgrüne Leuchtstoffröhren der Firma OSRAM (L 40/W/63), auf der anderen Seite wurde Rotlicht durch Leuchtstoffröhren der Firma PHILIPS (TL 40/W/15) erzeugt. Die eingestrahlte Lichtenergie wurde für beide Leuchtröhrentypen, soweit möglich, angeglichen. Die Messung der Lichtintensität erfolgte mit einer MOLL'schen Großflächenthermosäule Typ E₁ in Verbindung mit einem MULTI-FLEX-Galvanometer Typ M.G.F.O. Hierzu wurden für jede Seite auf der Innenfläche des Beckens zehn Meßpunkte von oben nach unten markiert. Der errechnete Mittelwert ergab für Rotlicht 5000 erg/cm²/sec., für Grünlicht 5500 erg/cm/sec. Die Wachstumsdauer auf Flaschen betrug im Schnitt zehn Tage. Ausnahmen machten alle Phormidiumspecies, Oscillatoria rubescens und Dermocarpa violaceae mit 26 Tagen. Während des Wachstums wurden alle Algen durch ein Verteilersystem mit einem 0,5 % Kohlensäure-Preßluftgemisch versorgt. Die Reinigung der verwendeten Preßluft erfolgte durch ein autoklavierbares vorgeschaltetes Stahlfilter, das mit Watte gefüllt war.

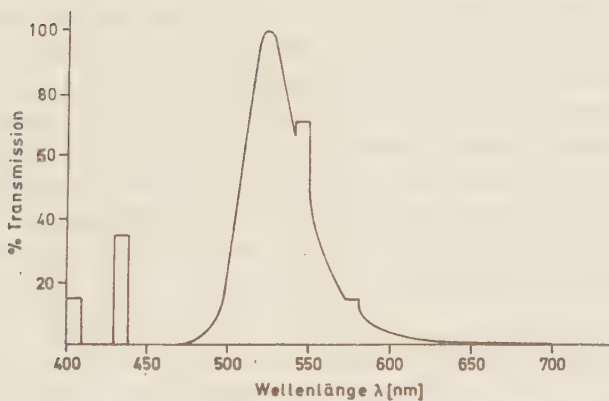


Abb. 46 a: Optische Charakteristik der Leuchtstoffröhre L 40/W/63 hellgrün (OSRAM).

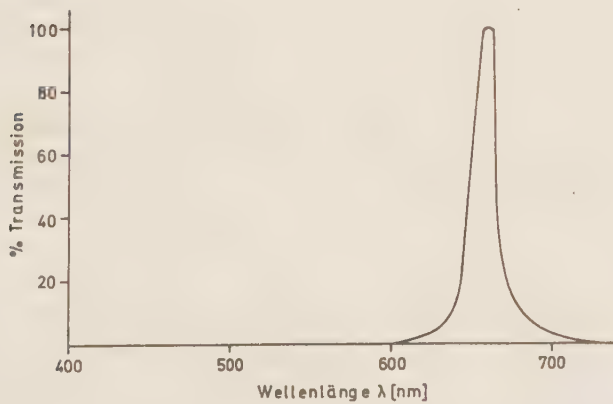


Abb. 46 b: Optische Charakteristik der Leuchtstoffröhre TL 40/W/15 rot (PHILIPS).

9.5.4. Tonnenkulturen

Für Tonnenkulturen verwendeten wir 80 l fassende PVC-Behälter mit Deckel. Zwei Bohrungen im Deckel ermöglichten das Einbringen von 40 W starken Leuchtstoffröhren, die von einem verschließbaren Glasmantel umhüllt waren. Durch eine weitere, kleinere Bohrung im Deckel wurde ein Glasstab geführt, durch den das Preßluft-Kohlensäuregemisch strömte. Zwei bis drei Flaschen von im Grünlicht gewachsenen Algen wurden im Verhältnis 1 : 1 auf Tonnen überimpft. In Abständen von sechs bis acht Tagen wurde mit 10 l frischem Medium aufgefüllt. Die Wachstumsdauer auf Tonnen betrug ein bis zwei Monate.

9.6. Erntebedingungen

Alle Erntevorgänge wurden mittels Zentrifugen der Firma WKF, Brandau bei Darmstadt, (G 50 K) durchgeführt. Die in Flaschen gewachsenen Algen wurden zweimal abzentrifugiert : 40 Minuten bei 18 000 x g, dann mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7 aufgeschlämmt und anschließend 30 Minuten bei 40 000 x g. Letzterer Vorgang ergab die Ausbeute (Naßgewicht). Die Tonnenernte erfolgte mit einem 2,8 l fassenden Durchflußrotor, der bei 10 000 Upm, entsprechend einer g-Zahl von 13 000, gefahren wurde. Auch hier wurde die von der Wand des Rotors abgekratzte Algenmasse in 0,1 M Natriumphosphatpuffer aufgeschlämmt und nochmals bei 40 000 x g abzentrifugiert.

9.7. Ausbeuten

In Tabelle 1 sind die bei Rot- und Grünlicht erhaltenen Ausbeuten verschiedener Blaualgen in Flaschenkulturen aufgeführt. Die Tonnenausbeuten betrugen für Pseudanabaena W 1173 115 g, Phormidium persicinum 64 g und Phormidium autumnale 118 g. Alle abzentrifugierten Algen wurden bis zur Verarbeitung in einem Gefrierfach bei -40° C aufbewahrt.

9.8. Aufschluß der Algenzellen

Die aufgetaute Algenmasse (1,5 g) wurde mit Glasperlen (15 g, ϕ 0,25 mm) gründlich verrieben und in einen 7 ml fassenden V₂A-Stahlbecher gefüllt. Mehrmaliges Aufstoßen des Bechers bewirkte ein optimales Zusammenpressen des Algen-Glasperlengemisches. Nach dem Abdichten, mittels einer Silikonscheibe, wurde der Becher auf eine Vibrogen Zelmühle (BÜHLER, Tübingen) geschraubt und unter Wasserkühlung gestoppte zehn Minuten bei höchster Schüttelfrequenz belassen.

9.9. Herstellung der Rohextrakte

Die wie oben aufgeschlossenen Zellen wurden pro 1,5 g Algen-naßgewicht mit insgesamt 10 ml frisch hergestelltem und auf 4° C abgekühltem 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 versetzt und gründlich aufgeschlämmt. Es folgte eine einstündige grobe Zentrifugation bei 4° C und 11 000 x g. Der Überstand wurde nochmals eine Stunde bei 4° C und 56 000 x g ultrazentrifugiert. Dieses Verfahren wurde für alle Rohextrakte der verschiedenen Algen und Untersuchungsmethoden angewendet.

10. Tris-Glycin-Elektrophorese pH 8,8

Die disk-elektrophoretische Auftrennung der Rohextrakte erfolgte auf T* = 7,7 %; C* = 2,6 % Acrylamidgelen in Glasröhrchen (0,6 x 10 cm) bei pH 8,8. Ein im Durchschnitt vierstündiger Lauf wurde in einer analytischen Säulenelektrophoreseapparatur der Firma SHANDON mit einem Fassungsvermögen von acht Gelröhrchen bei 4° C durchgeführt. An jedes Gel wurde mit Hilfe eines SHANDON-Netzgerätes (SAE 2761) eine konstante Stromstärke von 2 mA angelegt.

*) T ist der Gesamtprozentgehalt an Acrylamid; C ist der relative Prozentgehalt des Quervernetzers im Verhältnis zur Gesamtacrylamidkonzentration.

Zusammensetzung der Lösungen:

1. Kammerpuffer

6,0	g	Tris
28,8	g	Glycin
3,7	g	Titriplex III

2. Gelpuffer

36,6	g	Tris
0,23	ml	Temed
0,37	g	Titriplex III

Der Kammerpuffer wurde für Anoden- und Kathodenkammer in einer Verdünnung 1 : 10 verwendet.

Die Gelpufferlösung wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,8 eingestellt.

3. Acrylamidlösung

30,0	g	Acrylamid (SERVA)
0,8	g	Bisacryl (SERVA)
100	ml	Aqua dest.

4. Katalysator

150	mg	Ammoniumperoxodisulfat (MERCK)
100	ml	Aqua dest.

Lösung 1,2,3 wurden im Kühlschrank bei 4° C vorrätig gehalten und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur gebracht. Die Katalysatorlösung wurde stets frisch bereitet. Gelpuffer und Acrylamidlösung wurden vor Gebrauch fünf Minuten entgast. Die Mengenverhältnisse für die Gelzusammensetzung wurden den Angaben nach MAURER (84), System Nr. 1, entnommen. Die in die Glasröhrchen eingefüllten Gellösungen wurden zwecks glatter Oberfläche mit Butanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde ein Vorlauf von dreißig Minuten bei 2 mA pro Gel angesetzt um den überschüssigen Katalysator zu entfernen. 50 - 100 µl der 1 : 10 verdünnten Rohextrakte wurden mit zwei Tropfen einer 0,05 % wässrigen Bromphenolblaulösung und 10 mg Saccharose gemischt und auf die Gele aufgetragen.

11. Isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte wurde mit der auf Seite 115 beschriebenen Disk-Elektrophoreseapparatur mit den entsprechenden Gelröhrchen durchgeführt. Die bei 4° C vorrätig gehaltene Acrylamidlösung entsprach der auf Seite 116 angegebenen Konzentration. Als Trägerampholyt verwendeten wir Servalyt 40 % (SERVA) im pH-Bereich 2 - 11. Die Katalysatorlösung entsprach der bei WRIGLEY (121) angegebenen Konzentration. Mittels einer UV-Lampe (SHANDON) wurden die Gele (T 7,6 %; C 2,5 %) mindestens dreißig Minuten photopolymerisiert. Die Fokussierungslösung wurde in folgender Reihenfolge in einen, mit Eis gekühlten, 50 ml fassenden Erlenmeyerkolben einpipettiert:

Acrylamidlösung	6,0 ml
Servalyt	0,6 ml
Aqua dest.	16,4 ml
Katalysatorlösung	1,2 ml

Diese Mischung wurde im Exsiccator genau fünf Minuten entgast, in Gelröhrchen eingefüllt und mit Wasser überschichtet. Ein schon nach wenigen Minuten einsetzendes Ausbleichen des Riboflavins zeigte den Polymerisationsvorgang an. Nach dem Polymerisieren wurde das überstehende Wasser sorgfältig entfernt und die Gelröhrchen in die Elektrophoreseapparatur eingebracht. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurden im Gegensatz zur Disk-Elektrophorese die Pole vertauscht; Kathode unten, Anode oben. Die Kathodenkammer wurde mit einer 0,4 % (v/v) Triäthanolaminlösung gefüllt und die Gele mit dem unteren Ende eingesetzt. Auf jedes Gel kamen ca. 150 µl Schutzlösung einer Mischung von 0,5 ml einer 20 % Saccharoselösung, 1,5 ml Aqua dest. und 0,05 ml Servalyt. Mittels einer fein ausgezogenen Pasteurpipette wurden die zu fokussierenden Phycoerythrin- bzw. Phycocyaninlösungen unterschichtet. Die Proben enthielten ebenfalls 20 % Saccharose. Anschließend wurde die Anodenkammer mit einer 0,2 % (v/v) Schwefelsäure gefüllt und die Fokussierung bei konstanter Voltzahl (100 V) begonnen. Innerhalb von 30 Minuten wur-

de auf 300 V erhöht und so die Fokussierung bei Zimmertemperatur genau 2 Stunden durchgeführt.

Bestimmung des pH-Gradienten im Gel

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Polkappen jedes Geles sorgfältig abgespült und die Laufstrecke von jeder Proteinzone vermessen. Anschließend wurden die herausgelösten Gele in genau 1 cm lange Stücke geschnitten und in Reagenzgläsern mit je 1 ml autoklaviertem Aqua bidest. versetzt. Die mit Parafilm verschlossenen Reagenzgläser ließ man 2 - 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, wobei sie mehrmals umgeschüttelt wurden. Von jedem Eluat wurde der pH bestimmt. In einem Koordinatensystem wurde pro Zentimeter der gemessene pH-Wert eingetragen. In den daraus resultierenden pH-Gradienten wurde die Laufstrecke der Proteinzonen übertragen und der isoelektrische Punkt abgelesen. Bei der Bestimmung der isoelektrischen Punkte wurden die Gradienten von jedem einzelnen Gel bestimmt. Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier Bestimmungen.

12. Präparative Gelelektrophorese zur Isolierung von C-Phycocerythrin und C-Phycocyanin aus verschiedenen Cyanobakterien

Je nach Bedarf der notwendigen Menge an Biliproteiden wurden die Konzentrationen der Rohextrakte verändert. Dies geschah entweder durch Erhöhung der in Gramm aufzuschließenden Algenzellen oder durch eine Verminderung des Elutionspuffervolumens, sodaß sehr konzentrierte Rohextrakte entstanden. Denn es zeigte sich, daß ein geringeres Volumen der aufzutragenden Rohextrakte in der Gelelektrophorese für präparative Zwecke geeigneter war. Im allgemeinen wurden 2 - 3 g Algen unter den auf Seite 115 beschriebenen Bedingungen aufgebrochen und mit 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Der Gehalt an Biliproteiden im Grünlicht gewachsener Algen variierte von 0,67 - 5,75 mg/ml Rohextrakt. Zur Durchführung der präparativen Isolierung diente eine von der Werkstatt des Botanischen Instituts gebaute Elek-

trophoreseapparatur (40 x 40 x 16,5 cm) aus PVC, die 30 auf einem Kreis angeordnete Glasröhrchen (0,3 x 11,5 cm) aufnehmen konnte. Die Abstände der Elektrodenringe zu den Gelröhrchen betrugen 12 cm. Anoden- und Kathodenkammer wurden sowohl für den Vorlauf, als auch für den Hauptlauf mit je 4 l Elektrodenpuffer gefüllt. Gelkonzentration und Pufferzusammensetzung entsprachen den auf Seite 116 beschriebenen Angaben. Als Spannungsquelle diente ein LKB-Gerät 3371 E. Auf jedes Gel wurde 0,2 - 0,3 ml des mit Saccharose beschwerten Rohextraktes aufgetragen. Zum Sammeln der Proteine im Gel wurde zunächst eine Stromstärke von 25 mA / 90 V für die gesamten Röhrchen angelegt. Nach 1 Stunde erhöhte man auf 50 mA $\approx$ 180 - 200 V. Die elektrophoretische Auftrennung der Rohextrakte wurde so 10 - 12 Stunden bei 4° C durchgeführt. Anschließend eluierte man jeweils die Hauptbanden aus den Acrylamidfraktionen mit autoklaviertem Aqua bidest. Nach dreitägiger Elution wurde 36 Stunden gegen 0,05 M Natriumphosphatpuffer dialysiert und die Proben gefriergetrocknet.

Da im Falle der Aphanocapsa species (6701) bei normalen Elektrophoresebedingungen (vgl. S. 20) ein Durchmischen von Phycoerythrin und Phycocyanin zu beobachten war, wurde die Laufzeit auf 2 - 3 Stunden verkürzt bis sich Phycoerythrin und Phycocyanin genügend getrennt hatten. Hier betrug die angelegte Stromstärke sofort 50 mA. Selbst bei diesen Bedingungen konnte bei Calothrix membranaceae keine befriedigende Trennung erreicht werden, sodaß von einem Isolierungsversuch abgesehen werden mußte. Die vorauslaufende Zone von Phormidium persicinum wurde bei der Isolierung nicht berücksichtigt, da sie bereits proteolytisch degradiert war (vgl. S. 21 und S. 53, Abb. 23).

13. Molekulargewichtsbestimmung von Pseudanabaena W 1173 C-Phycoerythrin und C-Phycocyanin aus dem Rohextrakt

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte bei 4° C auf einer 1,6 x 80 cm großen Sephadex (PHARMACIA) G 200 Säule. Äquilibriert und entwickelt wurde die Säule mit einem 0,01 M Tris-HCl Puffer pH 7,0, der 0,1 M KCl, 1 mM NaN₃ und 1 mM EDTA enthielt. Zum

Eichlauf wurden je 5 mg Protein in 1 ml Elutionspuffer gelöst und getrennt auf die Säule aufgetragen; Ausnahme: Rinderserum-albumin 2 mg/ml. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 6 ml pro Stunde, wobei in 3 ml großen Fraktionen aufgefangen wurde. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden 2 ml des ultrazentri-fugierten, konzentrierten Pseudanabaena W 1173 Rohextraktes (entsprechend 1,5 mg Phycocyanin und 3,08 mg Phycoerythrin) auf die Säule aufgetragen.

14. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten von C-Phyco-erythrin und C-Phycocyanin verschiedener Cyanobakterien mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese

Zur Durchführung dieser Bestimmungen wurden die gleiche Elek-trophoreseapparatur und Glasröhrchen, wie auf Seite 115 beschrie-ben, verwendet. Die Auftrennung in Untereinheiten erfolgte bei Zimmertemperatur, wobei durch einen Föhn gekühlt wurde. Eine Acryl-amidstammlösung (44,4 g Acrylamid SERVA, 1,2 g Bisacrylamid SER-VA, Aqua dest. ad 1000 ml) wurde bei 4° C vorrätig gehalten. Gel- und Kammerpuffer entsprachen den Angaben bei WEBER und OSBORN (117) und wurden ebenfalls bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Katalysatorlösung (12 mg Ammoniumperoxodisulfat/ml) wurde vor Gebrauch stets frisch bereitet.

Zusammensetzung der Trenngellösung:

Gelpuffer	15	ml
Acrylamidlösung	6	ml
Ammoniumpersulfatlösung	1,5	ml
Temed	0,045	ml

Diese Mischung (Eisbad) reichte für 8 Gelröhrchen.

Acrylamidlösung und Gelpuffer wurden vorher getrennt 10 Minuten im Exsiccator entgast. Bisweilen, infolge starker Polymerisations-wärme, entstehende Blasen an den Rändern der Gele haben auf die Mobilität der Proteine keinen Einfluß. Auch hier wurde ein Vor-lauf von 30 Minuten bei 5 mA / Gel durchgeführt.

Herstellung der Eichproteinlösungen:

Verwendet wurden die Eichproteine Cytochrom C (MG = 12 500), Chymotrypsinogen A (MG = 25 000), Hühnereialbumin (MG = 45 000) und Rinderserumalbumin (MG = 67 000). Je 5 mg dieser Proteine wurden in 1 ml Gelpuffer gelöst. Diese Lösungen konnten bei 4° C bis zu drei Wochen aufbewahrt werden, ohne daß sich das auf Seite 35 abgebildete Elektrophoreseschema der Eichproteine merklich veränderte. Ausgefallenes SDS in den Eichlösungen konnte bei Zimmertemperatur wieder in Lösung gebracht werden. Wie aus Abbildung 47 hervorgeht, schwanken die Mobilitätswerte der Eichproteine untereinander. Deshalb wurde keine Standardkurve verwendet. Jede Molekulargewichtsbestimmung basierte auf einer speziellen Eichkurve.

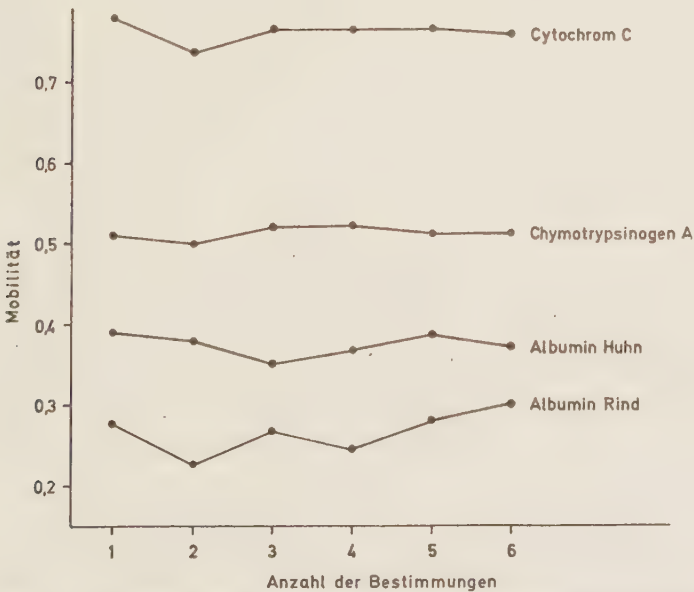


Abb. 47: Mobilitätsschwankungen der Eichproteine auf der SDS-Gelelektrophorese; aus 6 Bestimmungen ermittelt.

Vor dem Auftragen auf die Gele wurde von jeder Eichlösung 0,1 ml entnommen, mit 2 Tropfen doppelt destilliertem Glyzerin und 1 Tropfen einer 0,05 % wässrigen Bromphenolblaulösung versetzt und gut gemischt. Von jedem derartig hergestellten Eichproteingemisch wurden genau 50 µl getrennt auf die Gele aufgetragen und mit Kammerpuffer überschichtet. Die zu untersuchenden Phycoerythrinlösungen wurden vor der oben beschriebenen Behandlung mit wenig SDS versetzt, wobei ein deutliches Verschwinden der Fluoreszenz zu beobachten war. Die Auftragsmenge betrug 0,2 ml, was je nach Extinktion des Eluates bei 560 nm einer Phycoerythrinkonzentration von 0,02 - 0,04 mg entsprach. Nach dem Überschichten der Gele mit 1 : 1 verdünntem Kammerpuffer wurde an jedes Röhrchen eine anfängliche Stromstärke von 2,5 mA angelegt. Nach 30 Minuten wurde auf insgesamt 40 mA erhöht und diese Stromstärke 14 Stunden lang beibehalten. Die mittels einer Injektionsspritze herausgelösten Gele wurden nach dem Ausmessen der Gesamtlänge und der Wanderstrecke der Bromphenolblaubande 12 Stunden in einem Coomassie-Anfärbebad aufbewahrt (1,25 g Coomassie-Blau G 200 wurden in einer Mischung von 460 ml 50 % Methanol mit 50 ml Eisessig gelöst). Die Entfärbung der Gele erfolgte durch einfache Diffusion mit Entfärberlösung (75 ml Eisessig, 50 ml Methanol, 875 ml Wasser). Diese Methode wurde einer elektrophoretischen Entfärbung vorgezogen, da hierbei auch schwach angefärbte Proteinbanden erhalten blieben. Innerhalb von 4 Tagen wechselte man die Entfärberlösung täglich aus. Anschließend wurden die Gesamtgellängen und Wanderstrecken der jetzt sichtbar gewordenen Proteinbanden gemessen. Die Division der Proteinwanderstrecke durch die Bromphenolblau-Wanderstrecke ergab die Mobilität, wobei die Gellängen vor und nach Anfärben bzw. Entfärben berücksichtigt wurden.

15. Gelelektrophoretische Isolierung der Pseudanabaena W 1173
Untereinheiten

Zur Isolierung der beiden Ketten wurde die auf Seite 115 be-

schriebene Elektrophoreseapparatur verwendet. Gelpuffer und Gelkonzentration entsprachen den auf Seite 120 angegebenen Bedingungen zur SDS-Elektrophorese. Nach vierzehnstündiger Laufzeit wurden die Gele aus den Glasröhrchen herausgelöst und die beiden Untereinheiten mittels einer Rasierklinge ausgeschnitten und 3 Tage bei 4°C eluiert. Ausgefallenes Natriumdodecylsulfat wurde abzentrifugiert und die Eluate (je 4 ml) 2 Tage gegen dreimal 2 Liter Aqua dest. dialysiert. Zur Abtrennung des noch vorhandenen Acrylamids wurden 2 Pasteurpipetten mit Sephadex G 15 gefüllt und die Eluate chromatographiert.

15.1. Proteinbestimmung der gelelektrophoretisch isolierten Pseudanabaena W 1173 Untereinheiten

Zur Erstellung der Eichgerade wurden 50 mg Rinderserumalbumin (SERVA), nach zwölfstündigem Trocknen im Vakuumexsiccator über Blaugel, in 100 ml Aqua dest. (Meßkolben) gelöst. Aliquote Proteinkonzentrationen von 25, 50, 75, 100, 125 und 150 μg wurden in Reagenzgläser pipettiert. Unmittelbar vor der Bestimmung wurde das notwendige alkalische Kupferreagenz durch Mischen von 20 Teilen einer 10 % Natriumcarbonatlösung in 0,5 N Natronlauge und je 1 Teil einer 1 % Kupfersulfat- ($5\text{H}_2\text{O}$) und einer 2 % Kaliumnatriumtartratlösung hergestellt. Sowohl die Eichansätze, als auch je 250 μl der 1 : 1 verdünnten Phycoerythrinuntereinheiten-Eluate wurden mit dest. Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe 1 ml Kupferreagenz und 5 Minuten stehenlassen wurden je 3 ml des Folinreagenzes (MERCK) in der Verdünnung 1 + 10 dazugegeben. Nach einer Stunde wurden die Proben bei 750 nm gemessen.

15.2. Densitometrie der aufgetrennten Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinuntereinheiten nach Anfärben mit Coomassie-Blau

Zum An- und Entfärben der Untereinheiten wurden die gleichen Lösungen, wie auf Seite 122 beschrieben, verwendet. Die analytische

Auswertung der auf SDS-Acrylamidgelen aufgetrennten Untereinheiten wurde sowohl direkt, als auch nach Anfärbung mit Coomassie-Blau, mit einem VITATRON TLD 100 Densitometer in Verbindung mit einem integrierenden Schreiber (UR 400) ausgeführt. Mit einer Geschwindigkeit von 1 cm / Minute wurden die Gele in einer Schablone von einem Lichtstrahl, dem die Filter 559 zur direkten Messung und 609 für die angefärbten Untereinheiten vorgeschaltet waren, in Längsrichtung abgetastet. Die für die Densitometrie ausgewählten angefärbten Untereinheiten wurden doppelt so lange entfärbt (4 - 6 Tage Diffusion, bei täglich ausgewechselter Entfärberlösung) als es zur Molekulargewichtsbestimmung notwendig war.

16. Molekulargewichtsbestimmung der Phycocyanineluate vor und nach Inkubation mit 8 M Harnstoff und β -Mercaptoöthanol

Die nach präparativer Elektrophorese mit Aqua bidest. (3 Tage, 4° C) eluierten Phycocyaninzonen aus dem Rohextrakt wurden direkt zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet. Elektrophoresebedingungen, wie auf Seite 120 beschrieben. In 200 μ l der jeweiligen Eluate wurden 1 mg SDS gelöst. 100 μ l davon wurden mit 2 Tropfen β -Mercaptoöthanol (frisch destilliert) und 8 M Harnstoff versetzt und im Wasserbad 2 Stunden bei 37° C erwärmt. Pro Gel wurden 80 μ l des Inkubats aufgetragen.

17. Bedingungen für die spektralen Veränderungen des C 5 Phycoerythrins aus Phormidium autumnale

Sowohl die präparative, als auch die analytische Tris-Glycinelektrophorese und die isoelektrische Fokussierung wurden nach den Seiten 118 und 117 durchgeführt. Zur Untersuchung der spektralen Veränderungen wurden je 3 ml des 1 : 10 verdünnten Rohextraktes und des Phycoerythrineluates mit 30 mg Trypsin versetzt. In Abständen von 10 Minuten wurden von den Lösungen bei Zimmertemperatur Spektren in einem UNICAM SP 1 800 Spektral-

photometer gegen 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen.

17.1. Säulenchromatographische Isolierung des Phycoerythrins aus *Phormidium autumnale* (C5)

10 ml frisch hergestellter Phormidium autumnale Rohextrakt wurde mit 3,8 g Ammoniumsulfat ($\approx 50\%$) versetzt und bei 4°C 1 Stunde gerührt. Nach 30 Minuten Zentrifugieren bei 11 000 x g (CHRIST-Zentrifuge) war das gesamte Phycocyanin und die Hauptmenge des Phycoerythrins im Niederschlag. Der Überstand war schwach rot gefärbt. Sowohl der in 2 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer aufgenommene Niederschlag, als auch der Überstand (ca. 3 ml) wurden zweimal gegen 5 l 0,01 M Natriumphosphatpuffer dialysiert. Das Absorptionsspektrum des Überstandes war identisch mit dem Elektrophoreseeluat. Der konzentrierte, dialysierte Niederschlag wurde auf eine DAE-Cellulosesäule (1,6 x 2,5 cm), die mit einem 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8,0 und 1 mM EDTA äquilibriert war, aufgetragen und mit einem linearen KCl-Gradienten (0 - 0,3 M) entwickelt. Mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 6 ml / Stunde wurden Fraktionen von 4 ml aufgefangen.

18. Immunisierung der Kaninchen

1 mg monomeres Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin wurde in 1 ml PBS gelöst und mit 1 ml FREUND'schem Adjuvans versetzt. Mittels 2 an den Spitzen zusammengeschaubter Injektionsspritzen wurde eine stabile Emulsion hergestellt, von der ein in Wasser gegebener Tropfen nicht mehr zerfallen durfte. Jedes Kaninchen bekam von dieser Emulsion 1,5 - 2 ml subkutan, auf beide Seiten des Körpers verteilt, injiziert. Nach 10 Tagen folgte eine intramuskuläre "BOOSTER-Injektion" (0,5 mg Phycoerythrin, 0,5 ml PBS und 0,5 ml FREUND'sches Adjuvans). Diese Konzentration wurde auch für anschließende monatliche Injektionen verwendet. Das Antiphycoerythrinantiserum wurde durch die homologe Antigenpräzipita-

tion charakterisiert. Das Immunpräzipitat wurde mit PBS-Puffer gewaschen und in 0,1 M Natronlauge gelöst. Die Menge an Präzipitat wurde durch die Absorption bei 280 nm in einem ZEISS PMQ II Photometer bestimmt. Nach insgesamt 10 Wochen wurde den Tieren Blut aus der Ohrvene entnommen und der Antikörpertiter, wie oben beschrieben, bestimmt. Das für alle Methoden verwendete Antiserum stammte von einem Blut, das 6 Monate nach der ersten Injektion entnommen wurde.

19. Durchführung der Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY

Die Arbeitstechnik entnahm man den Laboratoriumsblättern für medizinische Diagnostik, BEHRING-Werke, Juli 1971.

Herstellung der phosphatgepufferten Saline pH 7,0 (PBS):

NaH_2PO_4	x	H_2O	0,2 M	33	ml
Na_2HPO_4	x 7	H_2O	0,2 M	67	ml
NaCl				8,5	g
Aqua dest.			ad 1000		ml

19.1. Herstellung der Agaroseplatten

2 g Agarose reinst (SERVA) wurden in 200 ml PBS bis zur Bildung einer klaren Lösung im Dampftopf auf 100° C erhitzt. Nach Zugabe von 2 ml einer 2 % Natriumazidlösung, als Konservierungsmittel, wurde die Agarose ca. 2 mm hoch in Einmal-Petrischalen (Ø 8,9 cm) gegossen. Nach dem Erstarren wurde auf das Unterteil der Petrischale eine Schablone aufgelegt, durch deren Öffnungen die Gelstanze geführt wurde. Die ausgestanzten Gelstücke wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die ausgestanzten Vertiefungen hatten einen Durchmesser von 2 mm und ein Fassungsvermögen von ca. 10 µl. Der Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt betrug 1 cm.

19.2. Geldiffusion

Eine zum Test vorbereitete Ouchterlonyplatte enthielt 6 ringförmig angeordnete und eine zentrale Vertiefung. In die mittlere Öffnung wurde das Antiserum von Pseudanabaena Phycoerythrin, in die äußeren das homologe Protein und die zu vergleichenden Phycoerythrine bzw. Rohextrakte aus anderen Algenspecies mittels einer Eppendorfpipette eingefüllt. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden für Rohextrakte verschiedene Antigenverdünnungsstufen eingesetzt. Um scharfe, stabile Präzipitationslinien zu erhalten, wurden die Rohextrakte mit PBS 1 : 1 oder 1 : 10 verdünnt. Die isolierten Phycoerythrine entsprachen einer Konzentration von 0,1 mg / ml in PBS. Die Diffusionsversuche wurden in einem mit Wasser gefüllten Exsiccator bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Beurteilung der Präzipitate erfolgte nach 2 Tagen.

20. Verwendeter Bakteriophagenstamm

Das Phycoerythrin wurde an T_4 -Bakteriophagen gekoppelt. Entwickelt wurde der Test mit den dazugehörenden Wirtsbakterien *Escherichia coli* B. Beide Organismen wurden nach ADAMS (1) gezüchtet und nach PUTNAM et al. (105) gereinigt. Alle Versuche wurden mit Hilfe der Doppelschichtagarmethode (Top-Agar-Bottom-Agar) nach ADAMS (1) durchgeführt. Die Bakteriensuspension bewahrte man in einem 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 auf, der in 1 Liter 20 mg Gelatine enthielt. Dieser Puffer fand sowohl für die Bakteriophagen, als auch für die Antiserumverdünnung Verwendung.

20.1. Herstellung des Pseudanabaena Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates

Das Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin wurde mittels Glutardialdehyd an die T_4 -Bakteriophagen gekoppelt. Hierzu wurden 40 mg

Phycoerythrin in 1 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 gelöst. 50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl T_4 -Bakteriophagensuspension (10^{13} PFU / ml) gemischt und anschließend mit 20 µl Glutardialdehyd (0,48 % v/v) versetzt. Diese Mischung ließ man 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und füllte sie danach mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 auf 5 ml auf. Die hierbei entstandenen groben Präzipitate wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 7 000 x g entfernt. Der Überstand enthielt nun das Phycoerythrin T_4 -Konjugat und das freie, nicht gekoppelte Protein. Phycoerythrin T_4 -Konjugat und freies Protein wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 20 000 x g getrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Gelatinepuffer gewaschen. Dies geschah durch Überschichten des Rückstandes mit 1 ml Gelatinepuffer, wobei darauf geachtet wurde den Rückstand nicht aufzuwirbeln. Pellet mit überschichtetem Gelatinepuffer wurden so 12 Stunden bei 4° C aufbewahrt. Danach wurde vorsichtig aufgeschüttelt und wiederum mit Natriumphosphatpuffer auf 5 ml aufgefüllt. Darauf folgendes niedertouriges und hochtouriges Zentrifugieren, Waschen und wiederum vorsichtiges Aufschütteln wurden noch zweimal wiederholt.

Tabelle 16: Überlebenszählung der gekoppelten Bakteriophagen

Verdünnung	Plaques		MW
1 (1 : 50)	∞	∞	∞
2 (1 : 2 500)	394	328	360
3 (1 : 125 000)	11	6	8
4 (1 : 725 000)	2	0	1

Nach dem letzten niedertourigen Zentrifugieren, 5 Minuten bei 7 000 x g, wurde eine Überlebenszählung der Bakteriophagen, die den Kopplungsprozeß überstanden hatten, durchgeführt (Tabelle 16). Dies geschah durch Plattieren einer fünfzigfachen Verdün-

nungsreihe des Konjugates auf einen Colibakterienrasen. Bezogen auf eine anfängliche Phagenkonzentration von 10^{13} überlebten bei der 2. Verdünnung (1 : 2 500) 0,02 % Bakteriophagen. Das Phycoerythrinkonjugat wurde bei 4° C aufbewahrt, wo es nach fünf Monaten noch stabil war.

20.2. Grobe Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates mit Antiphycoerythrinantiserum

Alle Inaktivierungsversuche wurden gleichfalls nach einer Methode von HAIMOVICH et al. (55) durchgeführt. Zunächst wurde eine grobe Inaktivierung der 98 - 100 % Punkte ermittelt. Vom Antiserum wurde mit 16 % Polyäthylenglycolpuffer (MG 6 000) eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} - 10^{-5} hergestellt. Zu je 50 μ l dieser Verdünnungsreihe wurde 50 μ l Bakteriophagen T_4 -Konjugat, welches 400 - 500 Plaques enthielt, gegeben. Diese Mischung wurde 2 Stunden bei 37° C im Wasserbad gehalten und anschließend 5 Minuten mit einem Überschuß (50 μ l) von Ziegenantikankinchen-gammaglobulin inkubiert (Komplexinaktivierung). Das Ziegen Serum wurde vorher mit einem 8 % Polyäthylenglycolpuffer im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. In je 2,5 ml frisch autoklavierten, im Wasserbad auf 47° C abgekühlten Top-Agar wurden 0,1 ml Escherichia coli Bakterien (3×10^9) gegeben. Zu dieser Mischung wurden nun das Serum und das T_4 -Konjugat gefüllt und sofort plattiert. Anschließend kamen die Platten ($\varnothing$ 9 cm) in einen Brutschrank, wo sie 12 - 18 Stunden bei 37° C aufbewahrt wurden. Die entstandenen Plaques wurden mittels eines BRUNSWICK-Gerätes ausgezählt. Da von jeder Verdünnungsserie 3 Platten angefertigt wurden, errechnete man den Mittelwert der ausgezählten Plaques. Tabelle 17 zeigt die Auswertung der groben Inaktivierung. Die sich daraus ergebende Kurve ist in Abbildung 48 dargestellt. Feine Hemmung der Inaktivierung, vergleiche Ergebnisteil.

Tabelle 17: Auswertung der groben Inaktivierung.

Antikörper- verdünnung	Platte 1	Platte 2	Platte 3	MW	P.F.U./ ml
10^{-2}	324	311	388	341	6820
10^{-3}	125	129	(61)	127	2540
10^{-4}	94	92	60	82	1640
10^{-5}	492	674	628	598	11960
10^{-10*}	1085	/	/		21700

*) Theoretisch ermittelter Wert

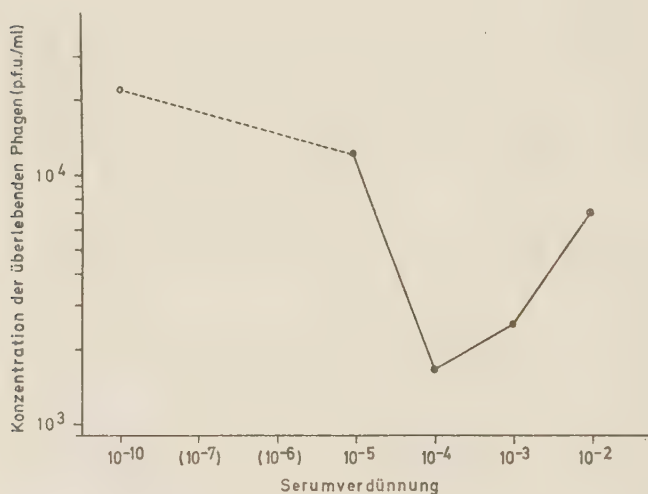


Abb. 48: Grobe Inaktivierung des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates mit Anti-Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrinantiserum.

20.3. Grobe Hemmung der Inaktivierung des Phycoerythrin-Bakteriophagen T_4 -Konjugates durch Antiphycoerythrinantiserum mit freiem Protein

Die methodische Ausführung wird hier anhand der groben Hemmung der Inaktivierung dargestellt. Die feine Hemmung der Inaktivierung (vgl. S. 68) unterscheidet sich nur hinsichtlich der Zwischenwerte in der Antikörperkonzentration. Der Arbeitsgang besteht aus der Eichkurve, die in diesem Fall mit der Inaktivierungskurve identisch ist und der eigentlichen Hemmkurve mit freiem Protein. Die Antiserumkonzentration 10^{-4} , die dem 95 %-Punkt entspricht, wird mit 16 % Polyäthylenglycolpuffer in einer Serie bis 10^{-6} verdünnt. Gleichzeitig wird von der freien Phycoerythrinlösung (1 mg/ml) eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen bis 10^{-9} hergestellt. Bei der Eichkurve kommen zu je 50 μ l Antiserum je 50 μ l Gelatinepuffer. Zu je 50 μ l Proteinverdünnung der Hemmkurve kommen 50 μ l Antiserum der Konzentration 10^{-4} . Eich- und Hemmkubatur wurden 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad gehalten. Nach Zugabe von 50 μ l Phagenkonjugat inkubierte man beide Ansätze 2 Stunden bei 37° C. Plattiert wurde, wie auf Seite 129 beschrieben. Analog zur Inaktivierung enthielten beide Ansätze einen 8 % Polyäthylenglycolanteil (39). Abbildung 49 b zeigt die Bestimmung des 50 %- Punktes des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins anhand der Auswertung der Tabelle 18 zur groben Hemmung der Inaktivierung.

20.4. Bedingungen für den Trypsin-Teilabbau des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins

Bedingungen für den Trypsinabbau:

1 mg elektrophoretisch gereinigtes Phycoerythrin wurde in 1 ml 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer pH 7,9 gelöst. Nach Zugabe von 1 μ g Trypsin (MERCK) wurde genau 20 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach Zusatz von 2 μ g Trasylol (Trypsininhibitor) wurde das Gemisch direkt für den Phagentest verwendet.

Tabelle 18: Grobe Hemmung der Inaktivierung.

a) Eichkurve

AK.- Verd.			MW		P.F.U./ ml
10^{-4}	40	42	39	40	806
6×10^{-5}	50	60	73	61	1220
3×10^{-5}	136	105	117	119	2386
10^{-5}	208	257	218	227	4540
6×10^{-6}	300	321	310	310	6206
3×10^{-6}	(316)*	389	408	398	7960
10^{-6}	422	(394)*	482	452	9040

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

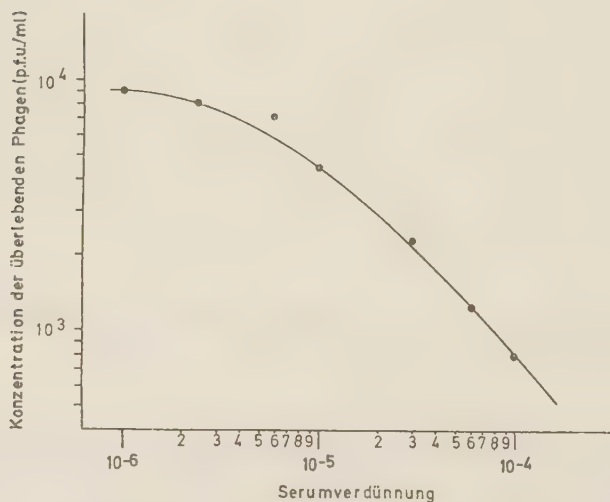


Abb. 49 a: Eichkurve zur groben Hemmung der Inaktivierung des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins.

Tabelle 18: Grobe Hemmung der Inaktivierung.

b) Hemmkurve

AG.- Verd.				MW	P.F.U./ ml	AK.d. Eichk.	% v. 10^{-4} Inaktiv.	% Hemmung
10^{-1}	(357)*	456	445	450	9000	> 10^{-6}	0	100
10^{-2}	230	(202)*	270	250	5000	$9,5 \times 10^{-6}$	9,6	90
10^{-3}	65	78	78	74	1480	$5,0 \times 10^{-5}$	50	50
10^{-4}	55	83	68	68	1360	$5,3 \times 10^{-5}$	53	47
10^{-5}	(68)*	49	37	43	860	$9,6 \times 10^{-5}$	96	4
10^{-6}	41	(56)*	43	42	840	10^{-4}	100	0
10^{-7}	38	43	36	39	780	< 10^{-4}	100	0
10^{-8}	43	45	(38)*	44	880	$9,5 \times 10^{-5}$	95	5
10^{-9}	57	51	(23)*	54	1080	$7,3 \times 10^{-5}$	73	27

*) Die eingeklammerten Werte wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

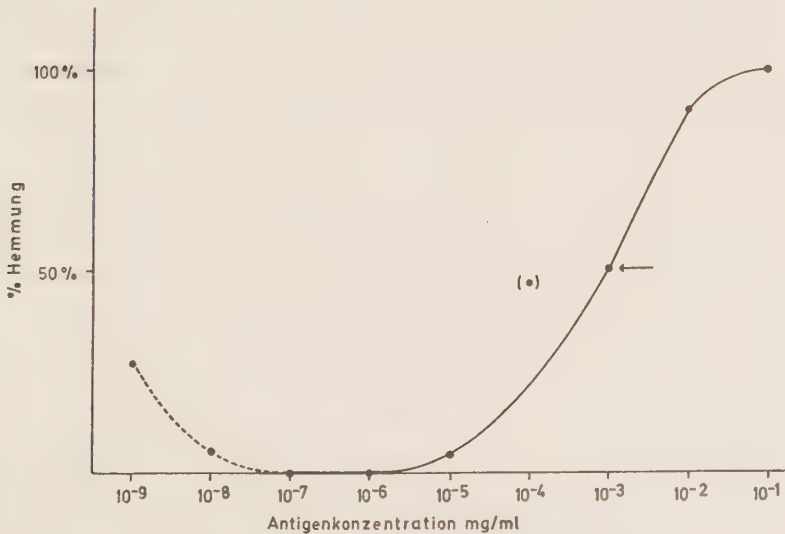


Abb. 49 b: Hemmkurve zur groben Hemmung der Inaktivierung des Pseudanabaena W 1173 Phycoerythrins.

Zum Vergleich mit dem intakten Phycoerythrin wurde die gleiche Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Sowohl der Ouchterlony-Doppeldiffusionstest, als auch die SDS-Gelelektrophorese entsprachen den Bedingungen auf Seite 126 bzw. Seite 120. In die gestanzten Diffusionsplatten wurden je 20 μ l zur Präzipitation verwendet. Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten wurde mit je 50 μ l durchgeführt.

20.5. Quantitative Präzipitationsreaktion

Von jedem der verwendeten Phycoerythrine wurde eine Stammlösung von 0,5 mg/ml in PBS hergestellt. Entsprechend den Mengen in μ g (25; 50; 75; 100; 150; 200) wurden die ml in Reagenzgläser pipettiert. Zu jeder Menge Phycoerythrin gab man konstant 0,1 ml Anti-Pseudanabaena W 1173 Antiphycoerythrinantiserum. Alle Proben wurden mit PBS-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Danach wurden die Proben bei 37° C inkubiert und weitere 48 Stunden bei 4° C aufbewahrt. Das entstandene Präzipitat wurde 4 Minuten in einer HETTICH-Mikroliterzentrifuge bei 15 000 x g abzentrifugiert. Das nicht präzipitierte Phycoerythrin bestimmte man durch Messung der jeweiligen Überstände bei 560 nm in einem ZEISS DMR 22. Ausgehend von der eingesetzten Menge Phycoerythrin wurde die Abnahme nach Präzipitation in Prozent berechnet.

Literaturverzeichnis

1. ADAMS, M.H.: Bacteriophages. Interscience, New York (1959)
2. ALLEN, M.M.: Photosynthetic membrane system in *Anacystis nidulans*. J. Bact. 96, 836 (1968)
3. ARNOLD, W. and OPPENHEIMER, J.R.: Internal conversion in the photosynthetic mechanism of blue-green algae. J. Gen. Physiol. 33, 423 (1950)
4. ARNON, R. and MARON, E.: Lack of immunological cross-reaction between bovine o-lactalbumin and hen's egg-white lysozyme. J. Mol. Biol. 51, 703 (1970)
5. BENNETT, A. and BOGORAD, L.: Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. Biochemistry, N.Y., 10, 3625 (1971)
6. BENNETT, A. and BOGORAD, L.: Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. J. Cell Biol. 58, 419 (1973)
7. BERNIS, D.S.: Immunochemistry of biliproteins. Pl. Physiol. 42, 1569 (1967)
8. BERNIS, D.S., CRESPI, H.L. and KATZ, J.J.: Isolation, amino acid composition and some physico-chemical properties of the protein deuterio-phycoerythrin. J. Am. Chem. Soc. 85, 8 (1963)
9. BERNIS, D.S., SCOTT, E. and O'REILLY, K.T.: C-phycoerythrin minimum molecular weight. Science, N.Y. 145, 1054 (1964)
10. BIGGINS, J.: Preparation of metabolically active protoplasts from the blue-green alga *Phormidium luridum*. Pl. Physiol. 42, 1442 (1967)
11. BJÖRN, G.S. and BJÖRN, L.O.: Photochromic pigments from blue-green algae: phycoerythrin a, b and c. Physiol. Plant 36, 297 (1976)
12. BOGORAD, L.: Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. In Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 369 (1975)

13. BOLD, H.O.: The cultivation of algae. Bot. Rev. 8, 69 (1942)
14. BORESCH, K.: Über die Einwirkung farbigen Lichtes auf die Färbung von Cyanophyceen. Ber. Dt. Bot. Ges. 40, 26 (1922)
15. BORESCH, K.: Die komplementäre chromatische Adaptation. Arch. Protistenkd. 44, 1 (1922)
16. BOURRELLY, P.: Les algues d'eau douce. Tome III, Editions N. Boubée & Cie (1970)
17. BRYANT, D.A., GLAZER, A.N. and EISERLING, F.A.: Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. Arch. Microbiol. Vol. 110, (1976)
18. CHAPMAN, D.J., COLE, W.J. and SIEGELMAN, H.W.: The structure of phycoerythrobilin. J. Am. chem. Soc. 89, 5976 (1967)
19. CHAPMAN, D.J., COLE, W.J. and SIEGELMAN, H.W.: Chromophores of allophycocyanin and R-phyococyanin. Biochem. J. 105, 903 (1967)
20. COHEN-BAZIRE, G. and BEGUIN, S.: Physico-chemical and immunological properties of allophycocyanins. Arch. Microbiol. 111, 225 (1977)
21. COHEN-BAZIRE, G. and LEFORT-TRAN, M.: Fixation of phycobili-proteins to photosynthetic membranes by glutaraldehyde. Arch. Microbiol. 71, 245 (1970)
22. COLE, W.J., CHAPMAN, D.J. and SIEGELMAN, H.W.: The structure of phycocyanobilin. J. Am. chem. Soc. 89, 3643 (1967)
23. COPE, B.T., SMITH, U., CRESPI, H.L. and KATZ, J.J.: Studies on the identity of ordinary and deuterophycocyanins. End groups, amino acid composition, minimum molecular weight and peptide maps. Biochim. Biophys. Acta 133, 446 (1967)
24. DAVIS, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
25. DEMETER, O.: Über Modifikationen bei Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. 24, 105 (1956), S. 130
26. DESIKACHARY, T.V.: Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. Academic. Press, New York and London (1959)

27. DIAKOFF, S. and SCHEIBE, J.: Action spectra for chromatic adaptation in *Tolypothrix tenuis*. *Plant. Physiol.* 51, 382 (1973)
28. DIAKOFF, S. and SCHEIBE, J.: Cultivation in the dark of the blue-green alga *Fremyella diplosiphon*. A photoreversible effect of green and red light on growth rate. *Physiol. Plant.* 34, 125 (1975)
29. DRAY, F., MARON, E., TILLISON, S.A. and SELA, M.: Immunochemical detection of prostaglandins with prostaglandin-coated Bacteriophage T₄ and by radioimmunoassay. *Anal. Biochem.* 50, 399 (1972)
30. DREWS, G.: Die Kultur der Cyanophyceen. *Naturw.* 42, 297 (1953)
31. DREWS, G., PRAUSER, H. und UHLMANN, D.: Massenvorkommen von *Synechococcus plancticus* nov. spec., einer solitären, planktischen Cyanophycee, in einem Abwasserteich. *Arch. Mikrobiol.* 39, 101 (1961)
32. DUYSSENS, L.N.M.: Transfer of light energy within pigment systems present in photosynthesizing cells. *Nature* 168, 548 (1951)
33. EDER, J., OSANAI, M., MANE, S. and REMBOLD, H.: Immunoassay for honey bee cytochrome c in single animals with cytochrome c-coated bacteriophages: A sensitive tool for the study of caste formation in the honey bee, *apis mellifera*. *Biochim. Biophys. Acta* 496, 401 (1977)
34. EDWARDS, M.R., BERNIS, D.S., GHIORSE, W.C. and HOLT, S.C.: Ultrastructure of the thermophilic blue-green alga, *Synechococcus lividus* Copeland. *J. Phycol.* 4, 283 (1968)
35. ENGELMANN, T.W.: Über experimentelle Erzeugung zweckmäßiger Änderungen der Färbung pflanzlicher Chromophylle durch farbiges Licht. *Arch. Anat. Physiol. Abt.*, p. 333 (1902)
36. ERIKSSON-QUENSEL, I.: The molecular weights of phycoerythrin and phycocyanin. *Biochem. J.* 32, 585 (1938)

37. FINDLEY, D.L., WALNE, P.L. and HOLTON, R.W.: The effects of light intensity on the ultrastructure of *Chlorogloea fritschii* Mitra grown at high temperatures. *J. Phycol.* 6, 182 (1970)
38. FOTT, B.: *Algenkunde*. VEB Fischer Verlag, Jena (1971)
39. FRANEK, F. and DOSKOCIL, J.: Inactivation of hapten-modified bacteriophage by antibody increased sensitivity of assay in media containing polyethyleneglycol. *Eur. J. Immunol.* 5, 216 (1975)
40. FUJITA, Y. and HATTORI, A.: Effect of chromatic lights on phycobilin formation in a blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. *Pl. Cell Physiol.* 1, 293 (1960)
41. FUJITA, Y. and HATTORI, A.: Photochemical interconversion between precursors of phycobilin chromoproteids in *Tolypothrix tenuis*. *Pl. Cell Physiol.* 3, 209 (1962)
42. GAIDUKOV, N.: Weitere Untersuchungen über den Einfluß farbigen Lichtes auf die Färbung der Oscillarien. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 21, 484 (1903)
43. GAIDUKOV, N.: Die komplementäre chromatische Adaptation bei *Porphyra* und *Phormidium*. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 24, 1 (1906)
44. GANTT, E.: Properties and ultrastructure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Pl. Physiol.* 44, 1629 (1969)
45. GANTT, E. and CONTI, S.F.: Ultrastructure of blue-green algae. *J. Bact.* 97, 1486 (1969)
46. GANTT, E., EDWARDS, M.R. and PROVASOLI, L.: Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *J. Cell Biol.* 48, 280 (1971)
47. GANTT, E. and LIPSCHULTZ, C.A.: Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. I. Isolation. *J. Cell Biol.* 54, 313 (1972)
48. GLAZER, A.N. and COHEN-BAZIRE, G.: Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 68, 1398 (1971)

49. GLAZER, A.N. and HIXSON, C.S.: Characterization of R-phyco-
cocyanin. *J. Biol. Chem.* 14, 5487 (1975)
50. GLAZER, A.N., COHEN-BAZIRE, G. and STANIER, R.Y.: Compara-
tive immunology of algal biliproteins. *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA 68, 3005 (1971)
51. GLAZER, A.N., COHEN-BAZIRE, G. and STANIER, R.Y.: Charac-
terization of phycoerythrin from a *Cryptomonas* sp. *Arch.*
Mikrobiol. 80, 1 (1971)
52. GOODMAN, J.W. and DONCH, J.J.: Phage-neutralizing activity
in light polypeptide chains of rabbit-antibody. *Immuno-*
chemistry 2, 351 (1965)
53. GRAY, B.H., LIPSCHULTZ, C.A. and GANTT, E.: Phycobilisomes
from a blue-green alga *Nostoc* species. *J. Bacteriol.* 116,
471 (1973)
54. GROTH, S.F. de St., WEBSTER, R.G. and DATYNER, A.: Two new
staining procedures for quantitative estimation of proteins
on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 377
(1963)
55. HAIMOVICH, J., HURWITZ, E., NOVIK, N. and SELA, M.: Prepa-
ration of protein-bacteriophage conjugates and their use
in detection of anti-protein antibodies. *Biochim. Biophys.*
Acta 207, 115 (1970)
56. HAIMOVICH, J., HURWITZ, E., NOVIK, N. and SELA, M.: Use of
protein-bacteriophage conjugates for detection and quanti-
tation of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 207, 125 (1970)
57. HARDER, R.: Lichtintensität und chromatische Adaptation
bei den Cyanophyceen. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 40, 26 (1922)
58. HARRIS, J.U. and BERNS, D.: Sequences of the N-terminus
portions of biliproteins. *J. Mol. Evol.* 15, 153 (1975)
59. HATTORI, A., CRESPI, H.L. and KATZ, J.J.: Association and
dissociation of phycocyanin and the effects of deuterium
substitution on the processes. *Biochemistry, N.Y.* 4, 1225
(1965)

60. HATTORI, A. and FUJITA, Y.: Crystalline phycobilin chromo-
proteins obtained from a blue-green alga, *Tolypothrix te-*
nuis. J. Biochem. Tokyo 46, 633 (1959)
61. HAXO, F.T., O'HEOCHA, C. and NORRIS, P.: Comparative stu-
dies of chromatographically separated phycoerythrins and
phycocyanins. Arch. Biochem. Biophys. 54, 162 (1955)
62. HIROSE, H. and KUMANO, S.: Spectroscopic studies on the
phycoerythrins from rhodophycean algae with special refe-
rence to their phylogenetical relations. Bot. Mag. Tokyo
79, 105 (1966)
63. HIROSE, H., KUMANO, S. and MADONO, K.: Spectroscopic stu-
dies on phycoerythrins from cyanophycean and rhodophycean
algae with special reference to their phylogenetical rela-
tions. Bot. Mag. Tokyo 82, 197 (1969)
64. KAO, O., BERNS, D.S. and MAC COLL, R.: C-phycocyanin mono-
mer molecular weight. Eur. J. Biochem. 19, 595 (1971)
65. KAO, O., BERNS, D.S. and TOWN, W.R.: The characterization
of C-phycocyanin from an extremely halo-tolerant blue-
green alga, *Coccochloris elabens*. Biochem. J. 131, 39 (1973)
66. KOBAYASHI, Y., SIEGELMAN, H.W. and HIRS, C.H.W.: C-Phyco-
cyanin from *Phormidium luridum*. Isolation of subunits. Arch.
Biochem. Biophys. 152, 187 (1972)
67. KÖST, H.P.: Strukturuntersuchungen an den Phycobiliprotei-
den B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phyco-
cyanin aus *Anacystis nidulans*. Dissertation Univ. München,
1974
68. KOLLER, K.P. and WEHRMEYER, W.: Characterization of two
isoproteins. Arch. Mikrobiol. 104, 255 (1975)
69. KRATZ, W.A. and MYERS, J.: Nutrition and growth of several
blue-green algae. Am. J. Bot. 42, 282 (1955)
70. KRUMMEL, W.M. and UHR, J.W.: A mathematical and experimen-
tal study of the kinetics of neutralization of bacterio-
phage X 174 by antibodies. J. Immunol. 102, 772 (1969)

71. KYLIN, H.: Über Phycoerythrin und Phycocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds). Ag. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 69, 169 (1910)
72. LAUTERBORN, R.: Die sapropelische Lebewelt. In Verh. Naturw. Verein Heidelberg 13, 437 (1914 - 1917)
73. LEE, S.S., YOUNG, A.M. and KROGMANN, D.W.: Site specific inactivation of the photophosphorylation reactions of *Anabaena variabilis*. Biochim. Biophys. Acta 180, 130 (1969)
74. LEMBERG, M.R.: Die Chromoproteide der Rotalgen. 1. Justus Liebigs Ann. Chem. 461, 46 (1928)
75. LEMBERG, M.R.: Pigmente der Rotalgen. Naturwissenschaften 17, 541 (1929)
76. LICHTLE, C. et GIRAUD, G.: Aspects ultrastructuraux particuliers au plaste du *Batracho spermum virgatum* (Sirdt)-Rhodophycée-Nemalionale. J. Phycol. 4, 281 (1970)
77. LKB 8100 Ampholine: Instruction Manual. LKB-Produkter AB S-161 25 Bromma 1, Sweden
78. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
79. MAC COLL, R., BERNIS, D.S. and GIBBONS, A.: Characterization of cryptomonad phycoerythrin and phycocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 177, 265 (1976)
80. MÄKELÄ, O.: Assay of anti-hapten antibody with the aid of hapten coupled bacteriophage. Immunology 10, 81 (1966)
81. MALLERY, C.H. and RICHARDSON, N.: Disc gel electrophoresis of biliproteins. Plant. Cell Physiol. 12, 997 (1971)
82. MARGOLIASH, E., NISONOFF, A. and REICHLIN, M.: Immunological activity of cytochrome c. J. Biol. Chem. 245, 931 (1970)
83. MARON, E. and BONAVIDA, B.: A sensitive immunoassay for human lysozyme in biological fluids. Biochim. Biophys. Acta 229, 273 (1971)
84. MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin New York (1971)

85. MAURER, P.H.: Methods in immunology and immunochemistry. (Williams C.A. and Chase M.W., eds.) Vol. III, pp. 1 - 58, Academic Press, New York (1971)
86. MAYER, G.: Untersuchungen am Phycocyanin verschiedener Blaualgen. Zulassungsarbeit (1976)
87. MOLISCH, H.: Das Phycoerythrin, seine Kristallisierbarkeit und chemische Natur. Bot. Zeitung 52, 177 (1894)
88. MOLISCH, H.: Das Phycocyanin, ein kristallisierbarer Eiweißkörper. Bot. Zeitung 53, 131 (1895)
89. MUCKLE, G.: Dissertation in Vorbereitung, 1977
90. NEUFELD, G.J. and RIGGS, A.: Aggregating properties of c-phycocyanin from *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 181, 234 (1969)
91. NULTSCH, W.: Trennung von Chromoproteiden durch Gelfiltration. Biochim. Biophys. Acta 52, 213 (1962)
92. O'CARRA, P. and O'hEOCHA, C.: Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. Phytochem. 5, 993 (1965)
93. O'CARRA, P. and O'hEOCHA, C.: Algal biliproteins and phycobilins. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Goodwin T. W., Academic Press; London, New York Vol 1, 328 (1976)
94. O'CARRA, P. and KILLILEA, S.D.: Subunit structures of C-phycocyanin and C-phycoerythrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1192 (1971)
95. O'hEOCHA, C.: Comparative biochemical studies of the phycobilins, Arch. Biochem. 73, 207 (1958)
96. O'hEOCHA, C.: The structure of the phycobilins. A.D. 292679 Armed services technical information agency Arlington Hall Station Arlington C.V. page 21, (1962)
97. O'hEOCHA, C.: Biliproteins of Algae. Ann. Rev. Plant. Physiol. 16, 415 (1965)
98. O'hEOCHA, C. and HAXO, F.T.: Some atypical algal chromoproteins. Biochim. Biophys. Acta 41, 516 (1960)
99. ORNSTEIN, L.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)

100. OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis, II. In: Progress in allergy 6, 30 (1962)
101. OUDIN, J.: Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis. In: Methods Med. Res. 5, 335 (1952)
102. PERIN, J.-P. and JOLLÈS, P.: Immunological comparison of bird and human lysozymes and of their "loop" regions. Biochim. Biophys. Acta 214, 222 (1970)
103. PRAGER, E.M. and WILSON, A.C.: The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. J. Biol. Chem. 246, 7010 (1971)
104. PRINGSHEIM, E.G.: Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung. VEB Fischer Verlag Jena (1954)
105. PUTNAM, F.W., KOZLOFF, L.M. and NEIL, J.C.: Purification and properties of escherichia coli bacteriophage T 6. J. Biol. Chem. 179, 303 (1949)
106. REYNOLDS, J.A. and TANFORD, C.: Gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245, 5161 (1970)
107. RIS, H. and SINGH, R.N.: Electron microscope studies on blue-green algae. J. biophys. biochem. Cytol. 2, 63 (1961)
108. RÜDIGER, W., O'CARRA, P. and O'HEOCHA, C.: Structure of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. Nature, Lond. 215, 1477 (1967)
109. SCHEIBE, J.: Photoreversible pigment. Occurrence in a blue-green alga. Science 176, 1037 (1972)
110. STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. and COHEN-BAZIRE, G.: Purification and properties of unicellular blue-green algae. Bact. Rev. 35, 171 (1971)
111. SVEDBERG, T. and KATSURAI, T.: The molecular weights of phycocyanin and of phycoerythrin from Porphyra tenera and of phycocyanin from Aphanizomenon flos-aquae. J. Am. chem. Soc. 51, 3573 (1929)

112. TAKEMOTO, J. and BOGORAD, L.: Subunits of Phycoerythrin from *Freymyella diplosiphon*: Chemical and immunochemical characterization. *Biochemistry* 14, 1211 (1975)
113. TANDEAU DE MARSAC, N.: Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bact.* 130, 82 (1977)
114. TCHAN, Y.T. and GOULD, J.: Use of antibiotics to purify blue-green algae. *Nature* 192, 1276 (1961)
115. TORJESEN, P.A. and SLETTEN, K.: C-Phycocyanin from *Oscillatoria agardhii*. I. Some molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* 263, 258 (1972)
116. VENKATARAMAN, G.S. and LORENZEN, H.: Biochemical studies on *Anacystis nidulans* during its synchronous growth. *Arch. Mikrobiol.* 69, 34 (1969)
117. WEBER, K. and OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, Nr. 16, 4406 (1969)
118. WEHRMEYER, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur von *Porphyridium violaceum* Kornmann mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung. *Arch. Mikrobiol.* 75, 121 (1971)
119. WEIGLE, W.O.: Immunochemical properties of the cross-reactions between anti-BSA and heterologous albumins. *J. Immunol.* 87, 599 (1961)
120. WILDMAN, R.B. and BOWEN, C.C.: Phycobilisomes in blue-green algae. *J. Bacteriol.* 117, 866 (1974)
121. WRIGLEY, C.: Gel Electrofocusing - a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. *Sci. Tools* 15, 17 (1968)
122. ZEHNDER, A.: In: CARR, N.G. and WHITTON, B.A.: The biology of blue-green algae. *Botanical Monographs* 2, 530 (1973)

Lebenslauf

Am 27. September 1946 wurde ich als Sohn des Apothekers Karl Wagenmann und seiner Ehefrau Paula, geb. Ries, in Ludwigshafen/Rhein geboren.

Von 1953 - 1957 besuchte ich die Volksschule in Mannheim-Käfertal.

Im Oktober 1966 legte ich am Neusprachlichen Kurpfalz-Gymnasium in Mannheim das Abitur ab.

Eine zweijährige Praktikantenzeit in der Adler-Apotheke, Mannheim-Waldhof, beendete ich im Oktober 1968 mit dem pharmazeutischen Vorexamen in Karlsruhe.

Im Sommersemester 1969 begann ich in München das Studium der Pharmazie, das ich im Februar 1972 mit dem Staatsexamen abschloß. Mit Wirkung vom Juli 1972 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Seit November 1973 arbeitete ich unter Leitung von Prof. Dr. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München an vorliegender Arbeit.

Im Juli 1975 heiratete ich Fräulein Gabriele Wenninger.

